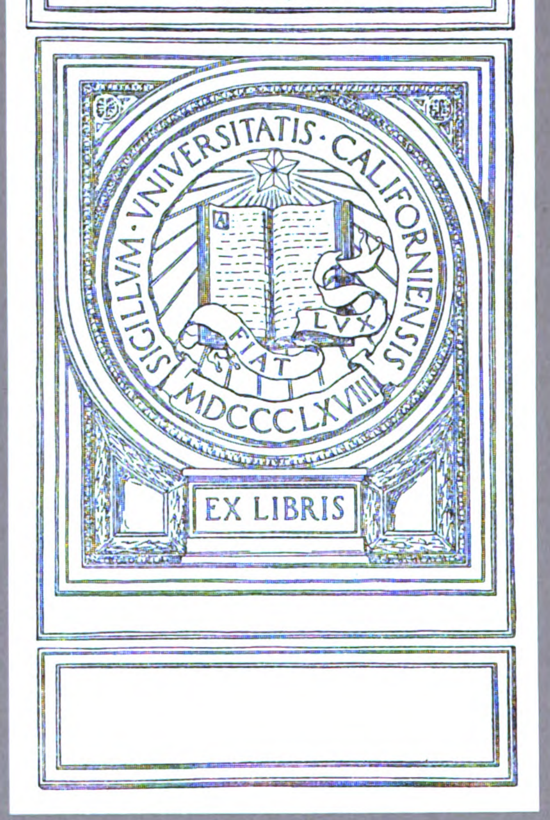

UC-NRLF
B 3 778 047


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS


Digitized by Google

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, **C. von Noorden**-Frankfurt a. M.
E. Salkowski-Berlin, **A. von Wassermann**-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundneunter Band

Ausgegeben am 17. September 1920



Berlin
Verlag von Julius Springer
1920

 Inhaltsverzeichnis.

Seite

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundneunter Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1920

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Milz und Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Tokuji Togawa.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 11. Mai 1920.)

Inhaltsangabe:

Einleitung.

Über Milzstoffwechsel oder Milzfunktion wurden im Laufe der Jahrhunderte zahllose Experimente ausgeführt und auch zahllose spekulative Theorien aufgestellt. Erst von der Mitte des vorigen Jahrhunderts ab ist die Milz Gegenstand exakter Forschungen geworden. Doch wurden die neu erschienenen Angaben von einem Autoren bestritten und von einem anderen wieder bestätigt. Die Angaben, welche gegenwärtig von ziemlich vielen Autoren anerkannt werden, sind die Einflüsse der Milz in Eisenstoffwechselvorgängen, die Wirkung der Milz auf Blutkörperchen, ferner die Wirkung der Milz als Bildungsstätte von Antikörpern. Die Ergebnisse vieler anderer interessanter Experimente, z. B. Abhängigkeit zwischen Gallensekretion oder Gallenbestandteilen und der Milzfunktion, Zusammenhang zwi-

schen Pankreas und Milzfunktion, Zusammenhang zwischen der Verdauung und Milzfunktion, Antagonismus von Schilddrüse und Milz, Einfluß der Milz auf den respiratorischen Stoffwechsel und auf Eiweißstoffwechsel, Zusammenhang zwischen Thymus und Milz, das Zusammenwirken von Leber- und Milzextrakt, Wirkung der Milz auf die Darmperistaltik, die Angaben über proteolytische Enzyme der Milz usw., kann man vom jetzigen wissenschaftlichen Standpunkt aus weder verwerfen noch bestätigen.

Trotz ungeheuer vieler, bisheriger Experimente findet man in der Literatur überraschenderweise fast gar keine Angaben über die Funktion der Milz in Kohlenhydratstoffwechselvorgängen. Nur einige Arbeiten in diesen Gebieten kann ich hier erwähnen.

Ciofone und Gallerani halten die Milz für eine Drüse mit innerer Sekretion; sie stellten die Gegenwart von amylolytischen, steatolytischen Enzymen fest. Auch die Milz von Hund, Katze, Meerschweinchen, Huhn, Fisch, Frosch und Ratte enthält nach Hirata diastatisches Enzym. T. Tanaka hat festgestellt, daß das trockene Pulver der Schweinemilz Stärke und Glykogen spaltende Diastase enthält. Rusca studierte während der Hunger- und Verdauungsperiode die in der Milz vorhandenen Fermente und kam auf Grund seiner in vitro angestellten Untersuchungen zum Schluß, die Milz besitze keine Fermente mit peptischer, tryptischer oder Labfunktion, sondern vielmehr eine Diastase, die auf die Stärke einwirkt. Nach der Bestimmung von Gaswechsel der Milz hat Vezàr lösliche Stärke und Dextrose (Menge unklar) intravenös injiziert. Und nach ihm stieg der respiratorische Quotient des milzlosen Hundes sogleich, ein Zeichen, daß diese Kohlenhydrate verbrannt wurden. Die Änderung der Respiration war dieselbe wie beim normalen Tier. So konnte er einen Einfluß der Milzexstirpation auf die Verbrennung intravenös zugeführter Dextrose oder Amylum solubile nicht konstatieren.

Angeregt von Herrn Prof. Bürgi habe ich mich zuerst mit der Glykogenbestimmung der Leber nach Milzexstirpation beschäftigt. Und interessiert durch das erhaltene Resultat, habe ich mich weiter eingehend bemüht, die Funktion der Milz im Kohlenhydratstoffwechsel zu erforschen. Alle meine Experimente wurden unter der Leitung von Prof. Perelstein und Dr. Traczewski ausgeführt.

Die Methode der Glykogen- und Blutzuckerbestimmung.

I. Die Methode der Glykogenbestimmung.

Hierfür wurde hauptsächlich die Pflügersche Glykogenbestimmungsmethode kombiniert mit der Zuckerbestimmungsmethode nach Bertrand angewendet. 20—50 g Kaninchenleber, nach vorheriger Entfernung der

Gallenblase, wurden bei einmaligem Versuche verbraucht. Bei Fröschen wurde die ganze Leber, nach Entfernung der Gallenblase, mit 2—3 maliger Menge von 60 proz. Kalilauge gekocht und wegen ihres reichlichen Glykogengehaltes in einer 160—240fachen Menge von 96 proz. Alkohol über 12 Stunden lang stehen gelassen. Die neutralisierte, wässerige Glykogenlösung wurde genau nach Pflüger invertiert und wieder neutralisiert. 20—50 ccm dieser Lösung wurden nach Bertrand behandelt, und der Zuckergehalt wurde mit einer auf Oxalsäure eingestellten Kaliumpermanganatlösung titriert.

Die Bertrandsche Methode ist durch ihre scharfe Endreaktion ausgezeichnet und sie übertrifft besonders, wenn es sich um ganz geringe Zuckermengen handelt, die Polarisationsmethode nach Pflüger oder die Titrationsmethode von Fehling-Soxhlet. Die gewonnenen Zuckerwerte über 0,1% (nach Bertrand) wurden meist durch Polarimetrie kontrolliert. Die Resultate waren übereinstimmend.

II. Die Methode von Blutzuckerbestimmung.

Alle Blutzuckerbestimmungen wurden genau nach Bangscher Mikromethode ausgeführt.

Vorbereitungen.

Als Versuchstiere habe ich Kaninchen und Frösche, einigemal wegen Kaninchenmangels Meerschweinchen gebraucht. Jedes Paar der Kaninchen bestand aus zwei Tieren (Versuchstier und Kontrolltier) von gleichem Wurf und von gleichem Geschlecht. 1—2 Wochen lang vor dem Experiment wurden beide Tiere im Kaninchenstall des Laboratoriums gehalten, möglichst gleichmäßig gefüttert, täglich gewogen und ihr Gesundheitszustand genau beobachtet. Ihr Futter bestand aus Rübenschnitzel, Kleie und Leinölkuchen.

Nach Milzexstirpation des einen Kaninchens wurden die beiden wiederum möglichst gleichmäßig gefüttert oder aber es wurde ihnen auch gleichzeitig jedes Futter vorenthalten (ausgenommen Wassertränkung). Die Milzexstirpation wurde unter strengster Asepsis und ohne Narkose ausgeführt. Der Blutverlust war fast gleich Null. Die operierten Tiere fraßen am folgenden Tage schon ziemlich gut, wenn nicht irgendeine Infektion stattfand, und lebten gewöhnlich ohne ersichtliche Störung ihres Wohlbefindens weiter.

Alle meinen Experimenten dienenden Winterfrösche waren Ranae esculentae, die in der gleichen Gegend des Kantons Bern gefangen und schon seit einigen Monaten im Keller des Instituts ohne Fütterung gehalten worden waren. Jedes Paar der Frösche bestand aus zwei Tieren (Versuchstier und Kontrolltier) von gleichem Geschlecht und mit ungefähr gleichem Körpergewicht. Sowohl vor dem Experiment als auch nach der Operation des einen Frosches wurden beide Frösche in einem bestimmten Topf des geheizten Laboratoriums gehalten. Bei Fröschen ist die Milzexstirpation ganz leicht ausführbar. Die Fütterung der Frösche wurde manchmal vorgenommen, und zwar in ganz passiver Weise. Man gab ihnen täglich einmal

ganz wenig Rind- oder Froschfleisch mit Stärke mittels geeigneter Pinzette tief in den Hals.

Als Kontrolltiere habe ich meist normale, gleichbehandelte Tiere oder ab und zu Tiere mit halbresezierter Milz gebraucht.

Das Töten von Kaninchen wurde immer durch Nackenschlag mit Hammer ausgeführt, und immer durch Sektion die einwandfreie Totalexstirpation der Milz gesichert.

I. Glykogenbestimmung nach Milzexstirpation.

A. Experimente an Kaninchen.

Experiment 1. ♂ Kaninchen A 1760 g, ♂ Kaninchen B 1950 g.

26. IX. Körpergewicht A 1935 g, B 2010 g.
27. IX. Körpergewicht A 1850 g, B 1980 g.
29. IX. Körpergewicht A 1810 g, B 1960 g.

Kaninchen B gegen 11h a. m. Milzexstirpation, nach Operation beiden jede Nahrung vorenthalten.

30. IX. Körpergewicht A 160 g, B 1820 g.
1. X. Körpergewicht A 1575 g, B 1750 g.
2. X. Körpergewicht A 1480 g, B 1730 g.

Gegen 9h 30′ a. m. beide Kaninchen getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 28,0 g, Glykogengehalt = 0,0753%.

Lebergewicht von Kaninchen B = 42,3 g, Glykogengehalt = 0,1291%.

Von den entsprechenden Glutealmuskeln der beiden Kaninchen je 20,0 g Muskel genommen und ihr Glykogengehalt bestimmt.

Muskelglykogengehalt von Kaninchen A = 0,0815%.

Muskelglykogengehalt von Kaninchen B = 0,12 %.

Experiment 2 ♂ Kaninchen A 1900 g, ♂ Kaninchen B 1850 g.

1. X. Kaninchen B Körpergewicht 1750 g, Milzexstirpation; nach Operation beide Tiere gleichmäßig gefüttert, Appetit ziemlich gut.

7. X. Körpergewicht A 1850 g, B 1600 g.
14. X. Körpergewicht A 1800, B 1670 g.
15. X. Morgens beide Tiere getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 34,0 g, Glykogengehalt = 0,6644%.

Lebergewicht von Kaninchen B = 25,5 g, Glykogengehalt = 0,2534%.

Muskelglykogengehalt von Kaninchen A = 0,4675%.

Muskelglykogengehalt von Kaninchen B = 0,1185%.

Experiment 3. ♀ Kaninchen A 1850 g, ♀ Kaninchen B 1950 g.

11. XI. Körpergewicht A 1877 g, B 2000 g.

Morgens Kaninchen A Milzexstirpation, Kaninchen B partielle Milzresektion; seit Operation beide gleichmäßig gefüttert.

12. XI. Körpergewicht A 1650 g, B 1810 g.
13. XI. Körpergewicht A 1550 g, B 1820 g.
14. XI. Körpergewicht A 1500 g, B 1810 g.
15. XI. Körpergewicht A 1520 g, B 1830 g.
17. XI. Körpergewicht A 1700 g, B 1810 g.

18. XI. Körpergewicht A 1735 g, B 1930 g.
19. XI. Körpergewicht A 1695 g, B 1880 g.
20. XI. Körpergewicht A 1740 g, B 1850 g.
21. XI. Körpergewicht A 1750 g, B 1865 g.
22. XI. Körpergewicht A 1730 g, B 1880 g.
24. XI. Körpergewicht A 1745 g, B 1805 g.
25. XI. Körpergewicht A 1830 g, B 1890 g.
26. XI. Körpergewicht A 1860 g, B 1920 g.

Beide Kaninchen getötet; bei Sektion fand sich die ziemlich vergrößerte Nebenmilz bei Kaninchen A.

Lebergewicht von Kaninchen A = 55,2 g, Glykogengehalt = 1,25%.
Lebergewicht von Kaninchen B = 53,2 g, Glykogengehalt = 1,45%.

Experiment 4. ♂ Kaninchen A 1620 g, ♂ Kaninchen B 1595 g.

18. XI. Körpergewicht A 1665 g, B 1675 g.
19. XI. Körpergewicht A 1635 g, B 1650 g.
21. XI. Körpergewicht A 1755 g, B 1720 g.

Nachmittags Kaninchen A Milzexstirpation, Kaninchen B partielle Milzresektion. Nach Operation beide Kaninchen zuerst gleichmäßig gefüttert.

22. XI. Körpergewicht A 1605 g, B 1560 g.
24. XI. Körpergewicht A 1560 g, B 1520 g.
25. XI. Körpergewicht A 1505 g, B 1605 g.
26. XI. Körpergewicht A 1530 g, B 1640 g.
27. XI. Körpergewicht A 1510 g, B 1725 g.
28. XI. Körpergewicht A 1520 g, B 1735 g.
29. XI. Von Morgen an beiden Kaninchen Futter entzogen.
1. XII. Körpergewicht A 1250 g, B 1490 g.
2. XII. Körpergewicht A 1140 g, B 1440 g.

Der Zustand von Kaninchen B mit halber Milz ziemlich schlecht. Das Kaninchen A ohne Milz verträgt das Hungern besser als das vorige. Beide getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 23,7 g, Glykogengehalt = 0,116%.
Lebergewicht von Kaninchen B = 32,6 g, Glykogengehalt = 0,045%.

Experiment 5. ♀ Kaninchen A 1800 g, ♀ Kaninchen B 1820 g.

15. XI. Körpergewicht A 1800 g, B 1850 g.
29. XI. Körpergewicht A 1860 g, B 1850 g.

Vormittags Kaninchen A Milzexstirpation, Kaninchen B partielle Milzresektion. Nach Operation beiden kein Futter gegeben.

30. XI. Körpergewicht A 1750 g, B 1700 g.
2. XII. Körpergewicht A 1500 g, B 1450 g.
4. XII. Körpergewicht A 1320 g, B 1300 g.

Der Zustand von Kaninchen B auch schlechter als der von Kaninchen A Beide getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 20,5 g, Glykogengehalt = 0,13%.
Lebergewicht von Kaninchen B = 18,5 g, Glykogengehalt = 0,0231%.

B. Experimente an Fröschen.

Experiment 6. ♂ Frosch A 55,5 g, ♂ Frosch B 71,5 g.

14. X. Morgens Frosch A Milzexstirpation. Nach Operation erhalten beide Frösche kein Futter gleichwie vor der Operation.

22. X. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch = A 3,8 g, Glykogengehalt = 12,54%.
Lebergewicht von Frosch = B 4,3 g, Glykogengehalt = 9,32%.

Experiment 7. ♀ Frosch A 52,5 g, ♀ Frosch B 53,5 g.

22. X. Frosch B Milzexstirpation, nach Operation beide nicht gefüttert.

27. X. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 2,7 g, Glykogengehalt = 10,03%.
Lebergewicht von Frosch B = 2,8 g, Glykogengehalt = 12,8%.

Experiment 8. ♀ Frosch A 57 g, ♀ Frosch B 52,5 g.

22. X. Frosch B Milzexstirpation, seither beide nicht gefüttert.

1. XI. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 1,8 g, Glykogengehalt = 4,64%.
Lebergewicht von Frosch B = 3,95 g, Glykogengehalt = 11,4%.

Experiment 9. ♂ Frosch A 37,7 g, ♂ Frosch B 41,0 g.

3. XI. Frosch B Milzexstirpation.

6. XI. Beide Frösche von jetzt an mit Rindfleisch und Stärke gefüttert.

10. XI. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 2,0 g, Glykogengehalt = 15,82%.
Lebergewicht von Frosch B = 1,7 g, Glykogengehalt = 12,1%.

Experiment 10. ♂ Frosch A 35,5 g, ♂ Frosch B 40,0 g.

8. XI. Frosch B Milzexstirpation und beide von jetzt an gefüttert.

13. XI. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 2,0 g, Glykogengehalt = 17,49%.
Lebergewicht von Frosch B = 3,5 g, Glykogengehalt = 11,24%.

Experiment 11. ♂ Frosch A 44,5 g, ♂ Frosch B 41,3 g.

10. XI. Frosch A partielle Milzresektion, Frosch B Milzexstirpation. Nach Operation beide gleichmäßig gefüttert.

17. XI. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 2,7 g, Glykogengehalt = 18,4%.
Lebergewicht von Frosch B = 2,5 g, Glykogengehalt = 13,5%.

Experiment 12. ♀ Frosch A 21,6 g, ♀ Frosch B 19,3 g.

17. XI. Frosch A partielle Milzresektion, Frosch B Milzexstirpation. Seither beide nicht gefüttert.

27. XI. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 1,32 g, Glykogengehalt = 17,8%.
Lebergewicht von Frosch B = 1,3 g, Glykogengehalt = 19,8%.

Der Glykogengehalt eines milzlosen Kaninchens und Frosches ist höher als der des gleichbehandelten Kontrolltieres, wenn beiden Tieren nach Operation des einen Tieres (resp. beider Tiere) gleichzeitig jede Fütterung versagt bleibt. Aber die Resultate sind anders, wenn man die beiden nach der Operation gleichmäßig füttert. Im letzten Fall sind die Glykogengehalte der milzlosen Tiere mehr oder weniger höher als die der Kontrolltiere.

Aus obigen Experimenten ist ersichtlich, daß die Milz eine gewisse Rolle in dem Kohlenhydratstoffwechsel spielt.

II. Leberglykogen- und Milzextraktinjektion.

Ich möchte hier des weiteren feststellen, welchen Einfluß Milzextrakt auf Leberglykogen hat, wenn er dem Tierkörper einverleibt wird. Schon ein Spanier hat in unserem Laboratorium danach geforscht und die ziemlich deutliche Abnahme von Leberglykogen nach Milzextraktinjektion gefunden. Aber die Arbeit ist bis jetzt leider nicht publiziert worden.

Meine Milzextrakte wurden, wie die anderen Organextrakte, die ich in anderen Experimenten gebraucht habe, auf folgende Weise hergestellt.

Das bestimmte Quantum des Milzorgans (in diesem Fall Kalbmilz) wurde mit Quarzsand im Mörser zerrieben, dann die gleichschwere, physiologische Kochsalzlösung hinzugesetzt, dies Gemisch 24 Stunden lang stehen gelassen, abkoliert, mit Äther überschichtet, wieder stehen gelassen und abfiltriert, bis die Lösung ganz klar war. Durch dieses Verfahren wurde fast das ganze darin enthaltene Eiweiß und ein Teil des Fettes entfernt; der gewonnene Extrakt unter der Ätherschicht ist ziemlich lange haltbar. 1 ccm von diesem Extrakt entspricht ungefähr 1 g vom betreffenden Organ.

Experiment 1. ♂ Meerschweinchen A 370 g, ♂ Meerschweinchen B 355 g (aus gleichem Wurf).

4. XII. Meerschweinchen A 3^h p. m. 1,5 ccm Kalbmilzextrakt intravenös injiziert. Die Fütterung gleichmäßig und gewöhnlich.

5. XII. Körpergewicht A 342 g, B 337 g.

Meerschweinchen A 3^h p. m. 3 ccm Kalbmilzextrakt intraperitoneal injiziert.

6. XII. Körpergewicht A 325 g, B 320 g.

Beide getötet.

Lebergewicht von Meerschw. A = 11,6 g, Glykogengehalt = 0,035%.

Lebergewicht von Meerschw. B = 11,0 g, Glykogengehalt = 0,114%.

Experiment 2. 2. XII. ♀ Meerschweinchen A 590 g, ♀ Meerschweinchen B 463 g (aus gleichem Wurf).

10. XII. Körpergewicht A 543 g, B 463 g.

12. XII. Meerschweinchen A (545 g) gegen 6h p. m. 4 ccm Kalbmilzextrakt subcutan injiziert. Fütterung wie gewöhnlich.

13. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Meerschw. A = 21,2 g, Glykogengehalt = 0,069%.

Lebergewicht von Meerschw. B = 20,0 g, Glykogengehalt = 0,114%.

Experiment 3. ♂ Kaninchen A 1600 g, ♂ Kaninchen B 1570 g.

16. XII. Kaninchen A 10h a. m. 10 ccm Kalbmilzextrakt subcutan injiziert. Nach Injektion beiden Kaninchen Futter vorenthalten.

17. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 35,5 g, Glykogengehalt = 0,123%.

Lebergewicht von Kaninchen B = 32,5 g, Glykogengehalt = 0,42%.

Experiment 4. ♀ Frosch A 31,5 g, ♀ Frosch B 30,0 g.

18. XII. Frosch A Kalbmilzextrakt 2 ccm subcutan injiziert. Nach Injektion den beiden kein Futter gegeben.

20. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 1,5 g, Glykogengehalt = 15,7%.

Lebergewicht von Frosch B = 1,3 g, Glykogengehalt = 14,6%.

Experiment 5. ♂ Frosch A 55,5 g, ♂ Frosch B 49,0 g.

19. XII. Frosch A Kalbmilzextrakt 4 ccm subcutan injiziert. Nach Injektion gleichmäßig gefüttert.

20. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 3,8 g, Glykogengehalt = 16,9%.

Lebergewicht von Frosch B = 3,5 g, Glykogengehalt = 16,3%.

Der injizierte Kalbmilzextrakt wirkt bei Meerschweinchen und Kaninchen, nicht aber bei Fröschen, glykogenabbauend.

III. Milzexstirpation und Blutzuckerbestimmung.

Vorausgesetzt, daß die Milz irgendeine Wirkung auf Leberglykogen hat, dann ist zu vermuten, daß die Milzexstirpation möglicherweise auf Blutzuckergehalt irgendeine Veränderung ausübe. Meine Versuche erstrecken sich auch nach dieser Richtung. Der Bequemlichkeit wegen habe ich als Versuchstiere hauptsächlich Kaninchen gebraucht. Die einzelnen Blutzuckerwerte sind die Durchschnittszahlen der dreimaligen Versuche genau nach Bang. Die Kaninchen wurden nach Milzexstirpation gleich gefüttert wie vorher.

Experiment 1. Kaninchen A 1820 g, Blutzuckergehalt vor Operation = 0,105%.

22. XII. Milzexstirpation.

23. XII. Körpergewicht 1790 g, Blutzucker = 0,105%.

24. XII. Körpergewicht 1700 g, Blutzucker = 0,1 %.

26. XII. Körpergewicht 1720 g, Blutzucker = 0,097%.

30. XII. Körpergewicht 1750 g, Blutzucker = 0,071%.
6. I. Körpergewicht 1770 g, Blutzucker = 0,077%.
7. I. Körpergewicht 1670 g, Blutzucker = 0,095%.

Experiment 2. Kaninchen B 1500 g, Blutzucker vor Operation = 0,095%.
23. I. Milzexstirpation.
24. I. Körpergewicht 1490 g, Blutzucker = 0,065%.
26. I. Körpergewicht 1360 g, Blutzucker = 0,07 %.
27. I. Körpergewicht 1360 g, Blutzucker = 0,064%.
28. I. Körpergewicht 1330 g, Blutzucker = 0,067%.
29. I. Körpergewicht 1400 g, Blutzucker = 0,078%.
30. I. Körpergewicht 1450 g, Blutzucker = 0,074%.
31. I. Körpergewicht 1450 g, Blutzucker = 0,098%.
2. II. Körpergewicht 1470 g, Blutzucker = 0,083%.

Die Veränderungen des Zuckergehaltes des Kaninchenblutes nach Milzexstirpation sind nicht auffallend oder ganz geringfügig, und zwar ist der Blutzuckergehalt des milzlosen Kaninchens etwas kleiner als der des normalen Kaninchens. Aber die Schwankungen gehen nicht weit über die beim normalen Tiere gefundenen Grenzen.

IV. Hyperglykämie und Milzextraktinjektion.

Wenn man durch Milzextraktinjektion eine gewisse Glykogenabnahme der Leber erreichen kann, und wenn man dadurch imstande ist, die Mobilisation von Zucker zu befördern, so ist auch zu vermuten, daß man durch Milzextraktinjektion eine Veränderung im Blutzuckergehalt hervorrufen kann.

Als Versuchstiere haben mir Kaninchen gedient. Die Kaninchen wurden während der Experimente gewöhnlich gefüttert, während der 6 Stunden dauernden Blutzuckeruntersuchungen jedoch nicht.

Experiment 1. Kaninchen A 1670 g, Blutzuckergehalt = 0,062%.
12. XII. 10^h a. m. Milzextrakt 3 ccm subcutan injiziert.
Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,074%
" " 2^h = 0,096%
" " $4^1/_2{}^h$ = 0,096%
" " 6^h = 0,067%
Tagesharn in 24 St. nach Injektion Zucker —.

Experiment 2. Kaninchen B, 1710 g, Blutzuckergehalt = 0,091%.
22. I. 10^h 30′ a. m. Milzextrakt 5 ccm subcutan injiziert.
Blutzuckergehalt nach $^1/_2{}^h$ = 0,137%
" " 1^h = 0,15 %
" " $1^1/_2{}^h$ = 0,12 %
" " 2^h = 0,098%
" " $2^1/_2{}^h$ = 0,075%

12. XII. Meerschweinchen A (545 g) gegen 6h p. m. 4 ccm Kalbmilzextrakt subcutan injiziert. Fütterung wie gewöhnlich.

13. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Meerschw. A = 21,2 g, Glykogengehalt = 0,069%.

Lebergewicht von Meerschw. B = 20,0 g, Glykogengehalt = 0,114%.

Experiment 3. ♂ Kaninchen A 1600 g, ♂ Kaninchen B 1570 g.

16. XII. Kaninchen A 10h a. m. 10 ccm Kalbmilzextrakt subcutan injiziert. Nach Injektion beiden Kaninchen Futter vorenthalten.

17. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Kaninchen A = 35,5 g, Glykogengehalt = 0,123%.

Lebergewicht von Kaninchen B = 32,5 g, Glykogengehalt = 0,42%.

Experiment 4. ♀ Frosch A 31,5 g, ♀ Frosch B 30,0 g.

18. XII. Frosch A Kalbmilzextrakt 2 ccm subcutan injiziert. Nach Injektion den beiden kein Futter gegeben.

20. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 1,5 g, Glykogengehalt = 15,7%.

Lebergewicht von Frosch B = 1,3 g, Glykogengehalt = 14,6%.

Experiment 5. ♂ Frosch A 55,5 g, ♂ Frosch B 49,0 g.

19. XII. Frosch A Kalbmilzextrakt 4 ccm subcutan injiziert. Nach Injektion gleichmäßig gefüttert.

20. XII. Beide getötet.

Lebergewicht von Frosch A = 3,8 g, Glykogengehalt = 16,9%.

Lebergewicht von Frosch B = 3,5 g, Glykogengehalt = 16,3%.

Der injizierte Kalbmilzextrakt wirkt bei Meerschweinchen und Kaninchen, nicht aber bei Fröschen, glykogenabbauend.

III. Milzexstirpation und Blutzuckerbestimmung.

Vorausgesetzt, daß die Milz irgendeine Wirkung auf Leberglykogen hat, dann ist zu vermuten, daß die Milzexstirpation möglicherweise auf Blutzuckergehalt irgendeine Veränderung ausübe. Meine Versuche erstrecken sich auch nach dieser Richtung. Der Bequemlichkeit wegen habe ich als Versuchstiere hauptsächlich Kaninchen gebraucht. Die einzelnen Blutzuckerwerte sind die Durchschnittszahlen der dreimaligen Versuche genau nach Bang. Die Kaninchen wurden nach Milzexstirpation gleich gefüttert wie vorher.

Experiment 1. Kaninchen A 1820 g, Blutzuckergehalt vor Operation = 0,105%.

22. XII. Milzexstirpation.

23. XII. Körpergewicht 1790 g, Blutzucker = 0,105%.

24. XII. Körpergewicht 1700 g, Blutzucker = 0,1 %.

26. XII. Körpergewicht 1720 g, Blutzucker = 0,097%.

30. XII. Körpergewicht 1750 g, Blutzucker = 0,071%.
6. I. Körpergewicht 1770 g, Blutzucker = 0,077%.
7. I. Körpergewicht 1670 g, Blutzucker = 0,095%.

Experiment 2. Kaninchen B 1500 g, Blutzucker vor Operation = 0,095%.
23. I. Milzexstirpation.
24. I. Körpergewicht 1490 g, Blutzucker = 0,065%.
26. I. Körpergewicht 1360 g, Blutzucker = 0,07 %.
27. I. Körpergewicht 1360 g, Blutzucker = 0,064%.
28. I. Körpergewicht 1330 g, Blutzucker = 0,067%.
29. I. Körpergewicht 1400 g, Blutzucker = 0,078%.
30. I. Körpergewicht 1450 g, Blutzucker = 0,074%.
31. I. Körpergewicht 1450 g, Blutzucker = 0,098%.
2. II. Körpergewicht 1470 g, Blutzucker = 0,083%.

Die Veränderungen des Zuckergehaltes des Kaninchenblutes nach Milzexstirpation sind nicht auffallend oder ganz geringfügig, und zwar ist der Blutzuckergehalt des milzlosen Kaninchens etwas kleiner als der des normalen Kaninchens. Aber die Schwankungen gehen nicht weit über die beim normalen Tiere gefundenen Grenzen.

IV. Hyperglykämie und Milzextraktinjektion.

Wenn man durch Milzextraktinjektion eine gewisse Glykogenabnahme der Leber erreichen kann, und wenn man dadurch imstande ist, die Mobilisation von Zucker zu befördern, so ist auch zu vermuten, daß man durch Milzextraktinjektion eine Veränderung im Blutzuckergehalt hervorrufen kann.

Als Versuchstiere haben mir Kaninchen gedient. Die Kaninchen wurden während der Experimente gewöhnlich gefüttert, während der 6 Stunden dauernden Blutzuckeruntersuchungen jedoch nicht.

Experiment 1. Kaninchen A 1670 g, Blutzuckergehalt = 0,062%.
12. XII. 10^h a. m. Milzextrakt 3 ccm subcutan injiziert.
Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,074%
" " 2^h = 0,096%
" " $4^1/_2{}^h$ = 0,096%
" " 6^h = 0,067%
Tagesharn in 24 St. nach Injektion Zucker —.

Experiment 2. Kaninchen B, 1710 g, Blutzuckergehalt = 0,091%.
22. I. 10^h 30′ a. m. Milzextrakt 5 ccm subcutan injiziert.
Blutzuckergehalt nach $^1/_2{}^h$ = 0,137%
" " 1^h = 0,15 %
" " $1^1/_2{}^h$ = 0,12 %
" " 2^h = 0,098%
" " $2^1/_2{}^h$ = 0,075%

Blutzuckergehalt nach 3^h = 0,043%
„ „ $3^1/_2{}^h$ = 0,035%

Tagesharn in 24 St. nach Injektion Zucker —.

Experiment 3. Kaninchen C, 1830 g, Blutzuckergehalt = 0,08%.

15. XII. 10^h a. m. Milzextrakt 5 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,172%
„ „ 2^h = 0,142%
„ „ $4^1/_2{}^h$ = 0,126%
„ „ 6^h = 0,08 %

Tagesharn in 24 St. nach Injektion Zucker —.

Nach subcutaner Milzextraktinjektion von 5 ccm tritt sicher leichte Hyperglykämie, manchmal als Reaktion mit Hypoglykämie begleitet, auf, aber keine Glucosurie.

Als Kontrollprobe habe ich physiologische Kochsalzlösung und Leberextrakt dem Tierleib subcutan injiziert und die etwaige Veränderung des Blutzuckergehaltes geprüft.

Experiment 4. Kaninchen B 1630 g, Blutzuckergehalt = 0,062%.

27. I. 10^h a. m. physiologische NaCl 10 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach $^1/_2{}^h$ = 0,068%
„ „ 1^h = 0,072%
„ „ $1^1/_2{}^h$ = 0,061%
„ „ 2^h = 0,06 %
„ „ $2^1/_2{}^h$ = 0,07 %
„ „ 3^h = 0,07 %
„ „ $3^1/_2{}^h$ = 0,06 %
„ „ 4^h = 0,04 %

Experiment 5. Kaninchen B 1700 g, Blutzuckergehalt = 0,079%.

23. I. 10^h a. m. Kalbleberextrakt 5 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach $^1/_2{}^h$ = 0,077%
„ „ 1^h = 0,094%
„ „ $1^1/_2{}^h$ = 0,072%
„ „ 2^h = 0,078%
„ „ $2^1/_2{}^h$ = 0,081%
„ „ 3^h = 0,046%
„ „ $3^1/_2{}^h$ = 0,044%

Experiment 6. Kaninchen B, 1700 g, Blutzuckergehalt = 0,063%.

26. I. 10^h a. m. Milzextrakt 5 ccm + Leberextrakt 5 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach $^1/_2{}^h$ = 0,08 %
„ „ 1^h = 0,08 %
„ „ $1^1/_2{}^h$ = 0,064%
„ „ 2^h = 0,075%
„ „ $2^1/_2{}^h$ = 0,054%
„ „ 3^h = 0,037%
„ „ $3^1/_2{}^h$ = 0,05 %.

Bei obigen Kontrollversuchen kommt keine Hyperglykämie, wohl aber ziemlich deutliche Hypoglykämie vor. Besonders interessant ist es, daß der Leberextrakt, wenn er kombiniert mit Milzextrakt subcutan injiziert wird, die hyperglykämische Wirkung des Milzextraktes hemmt.

V. Adrenalinhyperglykämie bzw. Adrenalinglucosurie und Milzexstirpation.

Die Wirkung von Milzextrakt hierauf.

Zuerst habe ich den normalen Verlauf von Adrenalinhyperglykämie betrachtet und nachher habe ich Adrenalin, kombiniert mit einer gewissen Menge Milzextrakt, subcutan injiziert. Dann habe ich weiter die Adrenalinhyperglykämie bei milzlosen und milzhaltigen Tieren untersucht. Da die Intensität der Glucosurie nach Adrenalininjektion unter verschiedenen Bedingungen sehr verschieden ist, so habe ich nur die Intensität der Hyperglykämie genau untersucht, indem die Zuckerprozentsätze des Tagesharns angegeben wurden.

Es wurden die Adrenalinpräparate von Höchst a. M. angewendet. Während der fortdauernden Blutzuckeruntersuchungen wurde den Kaninchen kein Futter gegeben.

Experiment 1. Kaninchen A 1700 g, Blutzuckergehalt = 0,11%.

10. XII. 2^h 30′ p. m. 0,1% Adrenalin 1 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,265%
„ „ 3^h = 0,2 %
„ „ 5^h = 0,14 %

24 St. Tagesharn = 100 ccm; Zucker: Fehling +++, Bertrand 1%.

17. XII. Körpergewicht 1675 g, Blutzucker = 0,113%.

10^h 20′ a. m. 5 ccm Milzextrakt subcutan injiziert.

10^h 50′ a. m. 1 ccm Adrenalin subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,248%
„ „ 3^h = 0,23 %
„ „ 5^h = 0,192%

24 St. Tagesharn = 80 ccm; Zucker: Fehling ++, Bertrand 0,07%.

Experiment 2. Kaninchen B 1800 g, Blutzuckergehalt = 0,086%.

11. XII. 10^h 45′ a. m. 0,1% Adrenalin 1 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,21 %
„ „ 4^h = 0,27 %
„ „ 6^h = 0,118%

24 St. Tagesharn = 70 ccm; Zucker: Fehling +++, Bertrand 3,5%.

18. XII. Körpergewicht 1835 g, Blutzucker = 0,11%.

10h 25′ a. m. 5 ccm Milzextrakt subcutan injiziert.
10h 55′ a. m. 1 ccm Adrenalin subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1h = 0,342%
„ „ 3h = 0,378%
„ „ 5h = 0,293%

24 St. Tagesharn = 95 ccm; Zucker: Fehling + + +, Bertrand 0,51%.

Experiment 3. Kaninchen C 1835 g.

22. XII. 3h p. m. Milzexstirpation.
23. XII. Körpergewicht 1790 g.
24. XII. Körpergewicht 1700 g.
30. XII. Körpergewicht 1720 g; Blutzuckergehalt = 0,097%.
9h 45′ a. m. 0,1% Adrenalin 1,0 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1h = 0,208%
„ „ 2h = 0,299%
„ „ 4h = 0,205%
„ „ 6h = 0,115%

24 St. Tagesharn = 120 ccm; Zucker: Fehling + + +, Bertrand 1,6%.

Experiment 4. Milzloses Kaninchen C 1770 g, Blutzuckergehalt = 0,077%.

6. I. 5 ccm Milzextrakt, kombiniert mit 1,0 ccm Adrenalin subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt nach 1h = 0,2 %
„ „ 2h = 0,253%
„ „ 4h = 0,316%
„ „ 5h = 0,273%
„ „ 6h = 0,234%
„ „ 7h = 0,142%

24 St. Tagesharn = 120 ccm; Zucker: Fehling + + +, Bertrand 3,19%.

Die Adrenalinhyperglykämie und die Adrenalinglucosurie treten auch bei milzlosen Tieren fast in gleicher Weise auf, wie bei normalen Tieren, nicht wie nach Exstirpation von Schilddrüse, Nebenschilddrüsen, oder Pankreas, wo man einen ziemlich deutlichen Einfluß der Operation auf Blutzucker und Harnzucker nach Adrenalininjektion beobachten kann.

Obgleich die Milzextrakte auch in diesen Experimenten eine gewisse hyperglykämische Wirkung besitzen, spielt doch die Milz keine große Rolle in Adrenalinhyperglykämie und Adrenalinglucosurie.

VI. Parenterale Traubenzuckerzufuhr bei milzlosen Tieren und Blutzucker.

Da die Milz, wie aus den bisherigen Experimenten ersichtlich ist, eine bestimmte Wirkung auf Zuckermobilisation hat, ist von Interesse, zu untersuchen, wie die Resorption von Traubenzucker-

lösung bei milzlosen Tieren stattfindet, wenn sie subcutan und intravenös dem Tierkörper injiziert wird, d. h. wenn sie ohne Mitwirkung der Leber direkt in den großen Kreislauf übergeht.

Experiment 1. Normales Kaninchen B 1710 g, Blutzuckergehalt = 0,12%.

29. XII. 2^h p. m. 15 proz. Traubenzuckerlösung 20 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt	nach	5′	= 0,157%
„	„	15′	= 0,164%
„	„	30′	= 0,244%
„	„	1^h	= 0,178%
„	„	$1^1/_2{}^h$	= 0,088%
„	„	2^h	= 0,03 %

Experiment 2. Milzloses Kaninchen A 1750 g, Blutzuckergehalt = 0,071%.

30. XII. 2^h p. m. 15 proz. Traubenzuckerlösung 20 ccm subcutan injiziert.

Blutzuckergehalt	nach	5′	= 0,097%
„	„	15′	= 0,125%
„	„	30′	= 0,2 %
„	„	1^h	= 0,184%
„	„	$1^1/_2{}^h$	= 0,134%
„	„	2^h	= 0,137%
„	„	$2^1/_2{}^h$	= 0,1%

Experiment 3. Milzloses Kaninchen A 1670 g, normales Kaninchen B 1795 g.

10. I. Blutzuckergehalt Kaninchen A = 0,095%, Kaninchen B = 0,086%.

10^h 15′ a. m. 15 proz. Traubenzuckerlösung je 20 ccm intravenös injiziert.

Blutzuckergehalt nach Injektion	Kaninchen A (ohne Milz)	Kaninchen B (normal)
15′	1,1 %	0,92 %
30′	1,017%	0,906%
1^h	1,016%	0,753%
$1^1/_2{}^h$	1,014%	0,490%
4^h	0,254%	0,127%
5^h	0,216%	0,115%
6^h	0,198%	0,109%
7^h	0,159%	0,092%

Während der Nacht ist das milzlose Kaninchen A gestorben.
Sektion: ohne Besonderheiten.

Experiment 4. Normales Kaninchen C, 1540 g, Blutzuckerlösung = 0,07%.

3. II. 10^h a. m. 15 proz. Traubenzuckerlösung 20 cmm intravenös injiziert.

Blutzuckergehalt	nach	15′	= 0,194%
„	„	30′	= 0,138%

Blutzuckergehalt nach 1^h = 0,114%
" " $1^1/_2$ = 0,1 %
" " 2^h = 0,135%
" " $2^1/_2{}^h$ = 0,119%
" " 3^h = 0,095%
" " $3^1/_2{}^h$ = 0,038%
" " 4^h = 0,031%

4. II. Körpergewicht 1520 g, Blutzucker = 0,061%.
5. II. Körpergewicht 1560 g, Blutzucker = 0,093%.
6. II. Körpergewicht 1550 g, Blutzucker = 0,095%.
7. II. Milzexstirpation.
17. II. Körpergewicht 1500 g, Blutzuckergehalt = 0,09%.
2^h p. m. 15 proz. Traubenzuckerlösung 20 ccm intravenös injiziert.

Blutzuckergehalt nach 15′ = 0,362%
" " 30′ = 0,362%
" " 1^h = 0,28 %
" " $1^1/_2{}^h$ = 0,217%
" " 2^h = 0,247%
" " $2^1/_2{}^h$ = 0,16 %
" " 3^h = 0,133%
" " $3^1/_2{}^h$ = 0,0825%
" " 4^h = 0,065 %.

Bei subcutaner Traubenzuckerinjektion, wo die Resorption der injizierten Zuckerlösung sehr langsam stattfindet, kommen keine deutlichen Unterschiede des Blutzuckergehaltes bei milzlosen und normalen Tieren vor. Doch ist die Dauer der leichten Hyperglykämie bei milzlosen Tieren länger als bei normalen Tieren.

Bei intravenöser Injektion von konzentrierter Traubenzuckerlösung kommt dagegen ein ziemlich deutlicher Unterschied zwischen beiden Blutzuckergehalten vor. Der Blutzuckergehalt des milzlosen Tieres nach der Injektion ist sichtlich größer und die Dauer dieser deutlichen Hyperglykämie sichtlich länger im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Man kann höchstwahrscheinlich hieraus schließen, daß der Zuckerverbrennungsprozeß des milzlosen Kaninchens weniger lebhaft ist, als der des normalen Kaninchens.

Als einen Beweis dessen kann man es auch betrachten, daß ein milzloses Kaninchen 1,8 g Traubenzucker pro Kilo nicht vertragen konnte, während Kaninchen gewöhnlich intravenös eine bedeutend höhere Dosis Traubenzucker ohne pathologische Erscheinungen vertragen.

VII. Glykogenbestimmung nach akuter Adrenalin- oder Strychninvergiftung bei milzlosen und normalen Tieren.

Wie wir schon von vielen Experimenten der früheren Autoren wissen, kann man durch akute Adrenalin- oder Strychninvergiftung einen ziemlich deutlichen Glykogenschwund in der betreffenden Tierleber hervorrufen. Zu diesen meinen Versuchen kam ich durch die Frage, ob man Unterschiede der Leberklykogengehalte zwischen milzlosen und normalen Tieren nach dieser Manipulation möglicherweise finden könne.

Experiment 1. ♂ Frosch A 50,5 g (vor einer Woche Milz exstirpiert), ♂ Frosch B 45,5 g.

9. I. 0,1% Adrenalin je 0,5 ccm injiziert, nach einigen Minuten Tod.
Lebergewicht von Frosch A = 2,1 g, Glykogengehalt = 12,276%.
Lebergewicht von Frosch B = 2,0 g, Glykogengehalt = 6,72 %.

Experiment 2. ♂ Frosch A 52,7 g (vor einer Woche Milz exstirpiert), ♂ Frosch B 42,9 g.

13. I. Frosch A 0,1% Adrenalin 1 ccm, Frosch B 0,5 ccm subcutan injiziert. Frosch A nach 30 Minuten, Frosch B nach 20 Minuten tot.
Lebergewicht von Frosch A = 1,02 g, Glykogengehalt = 14,276%.
Lebergewicht von Frosch B = 0,88 g, Glykogengehalt = 10,326%.

Experiment 3. ♂ Frosch A 35 g (vor 5 Tagen Milz exstirpiert), ♂ Frosch B 34 g.

19. I. 0,1% Strychnin je 1 ccm subcutan injiziert, nach einigen Minuten Tod unter heftigen Krämpfen.
Lebergewicht von Frosch A = 0,8 g, Glykogengehalt = 10,68%.
Lebergewicht von Frosch B = 0,54 g, Glykogengehalt = 5,1 %.

Experiment 4. ♀ Frosch A 30 g (vor einer Woche Milz exstirpiert), ♀ Frosch B 42 g.

20. I. 0,1% Strychnin je 1 ccm subcutan injiziert, nach 5 Minuten Tod.
Lebergewicht von Frosch A = 0,9 g, Glykogengehalt = 14,00%.
Lebergewicht von Frosch B = 1,02 g, Glykogengehalt = 4,37%.

Experiment 5. ♂ Kaninchen A 1700 g (vor 13 Tagen Milz exstirpiert), ♂ Kaninchen B 1850 g.

23. I. Von Morgen an kein Futter gegeben.
25. I. 0,1% Adrenalin je 10 ccm intravenös, nach 30—40 Minuten Tod.
Lebergewicht von Kaninchen A = 32,5 g, Glykogengehalt = 0,112%.
Lebergewicht von Kaninchen B = 30,5 g, Glykogengehalt = 0,035%.

Experiment 6. ♂ Kaninchen A 1850 g (vor 12 Tagen Milz exstirpiert), ♂ Kaninchen B 1600 g (vor 12 Tagen Milz halb reseziert).

Seit Operation beide Tiere gleichmäßig gefüttert.
1. II. 0,1% Adrenalin je 10 ccm intravenös injiziert, nach 20—30 Minuten Tod.

Lebergewicht von Kaninchen A = 34,2 g, Glykogengehalt = 0,6325%.
Lebergewicht von Kaninchen B = 26,2 g, Glykogengehalt = 0,05 %.

Experiment 7. ♂ Kaninchen A 1800 g (vor 16 Tagen Milz exstirpiert).
♂ Kaninchen B 1820 g (vor 16 Tagen Milz halb reseziert).

Seit Operation beide gleichmäßig gefüttert.

28. I. Vom Morgen an beiden kein Futter gegeben.

1. II. 0,1% Strychnin je 10 ccm subcutan injiziert, nach 50—60 Minuten Tod.

Lebergewicht von Kaninchen A = 20,5 g, Glykogengehalt = 0,12 %.
Lebergewicht von Kaninchen B = 18,1 g, Glykogengehalt = 0,0231%.

Der Leberglykogenschwund der milzlosen Tiere nach akuter Adrenalin- oder Strychninvergiftung ist kleiner, als der der Kontrolltiere. Diese Resultate stimmen mit denen der 1. Versuche, durch die bei milzlosen Tieren nach absolutem Hungern ein größerer Glykogengehalt als bei den gleichbehandelten Kontrolltieren festgestellt wurde, überein.

VIII. Fütterung mit Milz und Blutzucker.

Endlich habe ich den Fütterungsversuch mit Milz an einem Kaninchen 2 Wochen lang ausgeführt.

Ungefähr 1 kg frischer Pferdemilz wurde mit der Fleischhackmaschine fein zerhackt, in dem 100°-C-Trockenschrank 36 Stunden lang eingelegt, bis es ganz getrocknet war, dann im Mörser fein gepulvert. In dieser Weise bekam ich aus 1 kg frischer Milz ca. 150 g trockenes Milzpräparat. Dieses Milzpräparat, in gewöhnliches Futter gemischt, wurde dem Kaninchen 2 Wochen lang ohne Pause gegeben (tägliche Dosis ca. 10 g). Die Blutzuckerbestimmungen fanden jeden Morgen nüchtern statt.

Experiment 1. Kaninchen 1950 g.

Blutzuckergehalt vor Milzfütterung = 0,09%.
14. I. Seit diesem Abend täglich 10 g trockenes Milzpräparat gegeben.
15. I. Körpergewicht 1940 g, Blutzucker = 0,0921%.
16. I. Körpergewicht 1900 g, Blutzucker = 0,104%.
17. I. Körpergewicht 1940 g, Blutzucker = 0,0837%.
19. I. Körpergewicht 1950 g, Blutzucker = 0,103%.
20. I. Körpergewocht 2045 g, Blutzucker = 0,096%.
21. I. Körpergewicht 2070 g, Blutzucker = 0,093%.
22. I. Körpergewicht 2120 g, Blutzucker = 0,086%.
23. I. Körpergewicht 2070 g, Blutzucker = 0,07%.
24. I. Körpergewicht 2030 g, Blutzucker = 0,085%.
26. I. Körpergewicht 2130 g, Blutzucker = 0,121%.
27. I. Körpergewicht 2180 g, Blutzucker = 0,072%.
28. I. Körpergewicht 2130 g, Blutzucker = 0,07%.
29. I. Körpergewicht 2210 g, Blutzucker = 0,088%.

30. I. Körpergewicht 2210 g, Blutzucker = 0,079%.
31. I. **Milzfütterung aufgehoben.**
Körpergewicht 2150 g, Blutzucker = 0,071%.
Körpergewicht 2165 g, Blutzucker = 0,081%.

Durch Milzfütterung kommt keine Verminderung oder Vermehrung des Blutzuckergehaltes wenigstens nach 2 Wochen langer Fütterungsdauer vor. Auch der Tagesharn wurde jeden Tag auf Zucker ohne positives Resultat untersucht.

Schluß.

Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die milzlosen, nach Operation hungernden Tiere enthalten mehr Glykogen als die gleich behandelten Kontrolltiere. Die milzlosen Tiere speichern neues Glykogen von nach der Operation noch hinzukommender Nahrung schlechter auf im Vergleich mit den Kontrolltieren.

2. Der Milzextrakt wirkt auf Leberglykogen abbauend.

3. Die Blutzuckerbestimmungen vor und nach der Milzexstirpation sind im großen und ganzen fast gleich.

4. Nach subcutaner Milzextraktinjektion kommt leichte Hyperglykämie vor, aber keine Glucosurie.

5. Der Milzextrakt wirkt auf Adrenalinhyperglykämie fördernd. Die Milzexstirpation verursacht keine Störungen bei Auftreten von Adrenalinhyperglykämie bzw. Adrenalinglucosurie.

6. Bei intravenöser Traubenzuckerinjektion an milzlosen Tieren kommt deutlichere und länger dauernde Hyperglykämie im Vergleich mit den Normaltieren vor.

7. Der Glykogenverlust der Leber von der milzlosen, mit Adrenalin oder Strychnin akut vergifteten Tiere ist kleiner, als der der gleichbehandelten Kontrolltiere.

8. Nach trockener Milzfütterung des normalen Tieres findet keine Veränderung des Blutzuckergehaltes statt.

9. Die Milz nimmt im Kohlenhydratstoffwechsel eine gewisse Stellung ein und garantiert höchstwahrscheinlich in Verbindung mit teils gleichsinnig, teils antagonistisch wirkenden anderen endokrinen Organen, z. B. Pankreas, Leber, Nebennieren, Thymus, Schilddrüse, Nebenschilddrüsen und Hypophyse, den normalen Ablauf der Vorgänge im Kohlenhydratstoffwechsel.

Einfluß kolloidaler Kohlenhydratlösungen auf die peptische Eiweißverdauung in künstlichem Magensaft.

Von

T. Togawa.

(Aus dem sero-chemischen Institute der Universität zu Tokio.)

(Eingegangen am 11. Mai 1920.)

Um die Bedeutung des Vorhandenseins von Ptyalin im Speichel darzutun, hat L. A. I. Maxwell im Jahre 1915 einen interessanten Versuch mitgeteilt. Nach ihm adsorbiert eine kolloidale Kohlenhydratlösung (Stärke), sobald sie von Diastase nicht hydrolysiert wird, immer Pepsin und bedeutet daher eine große Störung für die Eiweißverdauung im Magen, während die nicht kolloidale (nicht gekochte) Stärke-Suspension keinen Einfluß darauf haben soll.

Beispielsweise soll die Dauer der peptischen Verdauung von Fibrin 4 mal länger sein bei der Anwesenheit von 2 proz. kolloidaler Stärkelösung als bei deren Abwesenheit. Um die Digestionsgrade zu vergleichen, hat er die Grütznersche Methode angewandt.

Weil die oben erwähnte Störung durch kolloidale Lösungen von Kohlenhydraten für die Ernährung besonders von Kindern eine unabsehbare Bedeutung haben wird, da verschiedene kolloidale Lösungen von Kohlenhydraten fast alltäglich mit Kuhmilch oder anderen Eiweißpräparaten den Kindern zugeführt werden, habe ich eine Nachprüfung vorgenommen. Und um die Aufgabe möglichst gründlich zu lösen, habe ich zuerst die Edestinprobe und dann die quantitativen Stickstoffbestimmungen in Verdauungssäften durchgeführt.

I. Edestinprobe.

Die nötigen Reagenzien sind:

1. $^{n}/_{20}$-HCl-Lösung.
2. Gesättigte NaCl-Lösung.

3. 0,1 proz. Edestinlösung in $^{n}/_{30}$-HCl.
4. 0,1—0,5 proz. Pepsinlösung in $^{n}/_{30}$-HCl.
5. Kolloidale Stärkelösung von verschiedenen Konzentrationen.

Als erste Reihe der Probe wurden die absteigenden und aufsteigenden Mengen von Pepsin- und HCl-Lösungen und die bestimmten Mengen von Edestin-Lösung genommen, als zweite Reihe dazu noch die bestimmten Mengen von kolloidaler Stärkelösung, wie die folgenden Tabellen (I und II) zeigen.

Nach vollendeter Mischung stellt man diese Gemische für eine halbe Stunde bei 37° C in den Brutschrank, fügt dann je 0,3 ccm gesättigte NaCl-Lösung hinzu und untersucht durch die eintretende Trübung den relativen Unterschied zwischen beiden Reihen.

(+) verdaut, (—) unverdaut.

Experiment 1 (s. Tabelle I).

Tabelle I A (1. Reihe).

	1	2	3	4	5	6	7
0,5% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
$^{n}/_{30}$-HCl	0	0,2	0,[illegible]	0,6	0,8	0	0,2
0,1% Edestin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
H_2O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Konz. NaCl	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	+	+	+	+	+	—	—

Tabelle I B (2. Reihe).

	1	1	3	4	5	6	7
0,5% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
$^{n}/_{30}$-HCl	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2
0,1% Edestin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
0,1% Stärke	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Konz. NaCl	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	+	+	+	+	+	—	—

Experiment 2 (s. Tabelle II).

Tabelle II A (1. Reihe).

	1	2	3	4	5	6	7
0,2% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
$^{n}/_{30}$-HCl	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2
0,1% Edestin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
H_2O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Konz. NaCl	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	+	+	+	+	—	—	—

Tabelle II B (2. Reihe).

	1	2	3	4	5	6	7
0,2% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
$^{n}/_{30}$-HCl	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2
0,1% Edestin	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
0,1% Stärke	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Konz. NaCl	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	+	+	+	+	−	−	−

Experiment 3 (kurz geschrieben).

1. Reihe.

0,1% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
	+	+	+	+	−	−	−

2. Reihe (+ 0,1% Stärke je 0,2).

	+	+	+	+	−	−	−

Experiment 4.

0,1 proz. Pepsin-HCl-Lösung und 0,1-, 0,2-, 0,5 proz. Stärkelösung gebraucht.

0,1% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
	+	+	+	−	−	−	−
(+ 0,2% Stärke je 0,2)	+	+	+	−	−	−	−
(+ 0,5% Stärke je 0,2)	+	+	+	−	−	−	−
(+ 1,0% Stärke je 0,2)	+	+	+	−	−	−	−

Experiment 5.

0,1% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08
	+	+	+	+	−	−	−
(+ 1% Stärke 0,5) .	+	+	+	+	−	−	−

Experiment 6.

0,1% Pepsin	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
	+	+	+	+	−	−	−
(+ 0,5% Stärke 0,5) .	+	+	+	+	−	−	−

Wie die angegebenen Experimente zeigen, kann man durch die Edestinprobe keine Unterschiede in den Digestionsgraden zwischen beiden Reihen finden.

II. Qantitative Untersuchung.

Für diese Zwecke sind drei Eiweißpräparate: Eiereiweiß, Kuhmilch und Edestin gewählt.

A. Eiereiweißprobe.

Als 1. Mischung (stärkefrei):

Eiereiweiß (gekocht)	2,0	E. P.
0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	20,0	
$^{n}/_{30}$-HCl-Lösung	9,0	

Als 2. Mischung:

Eiereiweiß (gekocht)	2,0	E. P. S.
0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	20,0	
0,5 proz. Stärkelösung	6,0	
$^n/_{30}$-HCl-Lösung	3,0	

Die beiden Mischungen sind zwei Stunden lang in 37° C Brutschrank geblieben. Je 5 ccm verdaute Flüssigkeit wurde aus beiden Mischungen entnommen und nach Kjeldahls Methode ihr Stickstoffgehalt ermittelt (Doppelbestimmung).

N = absolutes Gewicht von Stickstoff.
D = Differenz.

Experiment 7

(1) N in 0,5 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0	D = 0
(2) a) N in E. P.	= 20,3 mg	
b) N in E. P.	= 20,3 mg	

Experiment 8.

(1) N in 0,5 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0	D = 3 mg.
(2) a) N in E. P.	= 20,3 mg	
b) N in E. P. S.	= 20,6 mg	

Experiment 9.

1 proz. Stärkelösung 6 ccm gebraucht.

(1) N in 1 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0,1 mg	D = 1 mg.
(2) a) N in E. P.	= 25,1 mg	
b) N in E. P. S.	= 25,3 mg	

Experiment 10.

0,5 proz.- und 1 proz. Stärkelösung je 6 ccm gebraucht (Verdauungszeitdauer 2 Stunden).

(1) N in 1 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0,1 mg	
(2) N in E. P.	= 5,7 mg	
(3) N in E. P. S. (0,5 proz.)	= 5,7 mg	D = 0
(4) N in E. P. S. (1 proz.)	= 5,7 mg	D = 0,1 mg.

Experiment 11.

0,5 proz. und 1 proz. Stärkelösung je 6 ccm, 1 proz. Stärkelösung 12 ccm gebraucht

(1) N in 1 proz. Stärkelösung 12 ccm	= 0,2 mg	
(2) N in E. P.	= 20,1 mg	
(3) N in E. P. S. (0,5 proz.)	= 20,2 mg	D = 0,1 mg
(4) N in E. P. S. (1 proz.)	= 20,2 mg	D = 0
(5) N in E. P. S. (1 proz., 12 ccm)	= 20,2 mg	D = 0,1 mg.

Experiment 12.

0,5 proz. Stärkelösung 6 ccm und 2 proz. Stärkelösung 6 ccm gebraucht.

(1)	a) N in 2 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0,3 mg	
	b) N in 0,5 proz. Stärkelösung 6 ccm	= 0	
(2)	N in E. P.	= 7,3 mg	
	N in E. P. S. (0,5 proz.)	= 7,3 mg	D = 0
	N in E. P. S. (2 proz.)	= 7,5 mg	D = 0,1 mg

B. Kuhmilchproben.

Die folgenden vier Mischungen sind hergestellt:

I.	Kuhmilch	10,0	M. P.
	0,5 proz. Pepsin-H-Cl-Lösung	20,0	
	$^n/_{30}$-HCl-Lösung	9,0	
II.	Kuhmilch	10,0	M. P. S.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	20,0	
	1 proz. Stärkelösung	6,0	
	$^n/_{10}$-HCl-Lösung	3,0	
III.	Destilliertes Wasser	10,0	P. S.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	20,0	
	1 proz. Stärkelösung	6,0	
	$^n/_{10}$-HCl-Lösung	3,0	
IV.	Destilliertes Wasser	10,0	P.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	20,0	
	$^n/_{30}$-HCl-Lösung	9,0	

Alle diese Mischungen wurden bei 37° im Brutschrank belassen, sodann je 5 ccm von diesen verdauten Flüssigkeiten genommen, durch 50 ccm Methylalkohol und einige Tropfen alkoholischer Zinkchloridlösung enteiweißt, je 20 ccm der letzten Filtrate wurden dann dem Kjeldahlschen Verfahren unterworfen.

Experiment 13.

(1)	N in M. P.	= 54,6 mg	
(2)	N in M. P. S.	= 53,3 mg	D = 1,3 mg.
(3)	N in P. S.	= 24,5 mg	
(4)	N in P	= 24,5 mg	

Experiment 14

Kuhmilch 5 ccm genommen.

(1)	N in M. P	= 71,5 mg	
(2)	N in M. P. S	= 71,5 mg	D = 0
(3)	N in P. S.	= 35,7 mg	
(4)	N in P.	= 35,7 mg.	

Da die Stickstoffmenge der Stärkelösung unmeßbar klein ist, so sind die Stickstoffbestimmungen von P. S. und P. in folgenden Experimenten ausgeschlossen.

Experiment 15.

0,5 proz. Stärkelösung und 1 proz. Stärkelösung je 6 ccm gebraucht (Verdauung $1^1/_2$ Stunde lang).

(1) N in M. P. . . . . = 41,0 mg
(2) N in M. P. S. (0,5 proz.) . . . . = 41,0 mg D = 0
(3) N in M. P. S. (1 proz.) . . . . = 41,0 mg.

Experiment 16.

0,5-, 1-, 2 proz. Stärkelösung je 6 ccm gebraucht.

(1) N in M. P. . . . . = 50,3 mg
(2) N in M. P. S. (0,5 proz.) . . . . = 50,3 mg D = 0
(3) N in M. P. S. (1 proz.) . . . . = 50,3 mg D = 0
(4) N in M. P. S. (2 proz.) . . . . = 50,3 mg D = 0.

C. Edestinprobe.

Auch hier sind vier Mischungen bereitet.

I.	0,1 proz. Edestin-HCl-Lösung	20,0	Ed. P
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	1,0	
	$^n/_{30}$-HCl-Lösung	9,0	
II.	0,1 proz. Edestin-HCl-Lösung	20,0	Ed. P. S.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	1,0	
	1 proz. Stärkelösung	6,0	
	$^n/_{10}$-HCl-Lösung	3,0	
III.	Destilliertes Wasser	20,0	P. S.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	1,0	
	1 proz. Stärkelösung	6,0	
	$^n/_{10}$-HCl-Lösung	3,0	
IV.	Destilliertes Wasser	20,0	P.
	0,5 proz. Pepsin-HCl-Lösung	1,0	
	$^n/_{30}$-HCl-Lösung	9,0	

Diese Gemische wurden 30 Minuten lang bei 37° belassen; dann je 5 ccm von den verdauten Flüssigkeiten dem Enteiweißungsverfahren durch Methylalkohol und Zinkchlorid ausgesetzt und von je 20ccm der letzten Filtrate durch Kjedahl der Stickstoffgehalt bestimmt. Da die Stickstoffmenge der Stärkelösung, wie schon in der Kuhmilchprobe angegeben wurde, unmeßbar klein ist, so sind die Stickstoffbestimmungen von P. S. und P. hier fortgelassen.

Experiment 17.

(1) N in Ed. P. S. . . . . = 27,3 mg
(2) N in Ed. P. S. . . . . = 28,4 mg D = 1,1 mg.

Experiment 18.

(1) N in Ed. P. . . . . = 20,0 mg
(2) N in Ed. P. S. . . . . = 21,0 mg D = 1,0 mg.

Experiment 19.

(1) N in Ed. P. . . . . = 14,7 mg
(2) N in Ed. P. S. . . . . = 13,7 mg D = 1,0 mg.

Experiment 20.

(1) N in Ed. P. . . . . = 18,9 mg
(2) N in Ed. P. P. S. . . . . = 18,9 mg D = 0.

Experiment 21.

0,5 proz. und 1 proz. Stärkelösung je 6 ccm gebraucht.

(1) N in Ed. P. . . . . = 16,8 mg
(2) N in Ed. P. S. (0,5 proz.) . . . = 16,8 mg D = 0
(3) N in Ed. P. S. (1 proz.) . . . . = 16,8 mg D = 0.

Experiment 22.

0,5 proz. und 2 proz. Stärkelösung je 6 ccm gebraucht.

(1) N in Ed. P. . . . . = 13,7 mg
(2) N in Ed. P. S. (0,5 proz.) . . . = 12,6 mg D = 1,1 mg
(3) N in Ed. P. S. (2 proz.) . . . . = 12,6 mg D = 1,1 mg.

Nach dem obigen Experiment kann man die Tatsache feststellen, daß die kolloidalen Stärkelösungen (Vertreter der Kohlenhydrate) bei der peptischen Verdauung in künstlichem Magensaft winzig kleine oder gar keine Störungen bewirken. Die resultierende geringe Differenz der Stickstoffmenge zwischen stärkefreier und stärkehaltiger Flüssigkeit ist mehr als technischer Fehler zu betrachten.

Im großen und ganzen kann man daher vermuten, daß die Kohlenhydrate im kolloidalen Zustande, wenn sie auch in irgendeinem Fall durch Speichel schlecht hydrolysiert werden oder aus irgendeinem Grunde ganz unverändert bleiben, doch nach Einführung in den Magen noch keine nennenswerten Störungen auf die peptische Eiweißverdauung ausüben.

Zum Schluß meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Herrn Professor Dr. S. Mita für die Anregung und Leitung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literatur.

L. A. I. Maxwell, Biochemical Journ. 9, 323. 1915.

Die Fibrinferment- und Fibrinogenbestimmung nach der Injektion von normalen Seren in den normalen Tierkörper.

Von

T. Togawa.

(Aus dem sero-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 11. Mai 1920.)

Durch klinische Erfahrungen ist es uns schon lange bekannt, daß durch die Injektion eines normalen Menschen- oder Tierserums die Blutgerinnungsfähigkeit der so behandelten kranken Menschen (im Zustande ungenügender Blutgerinnung) in gewissem Maße gesteigert wird.

Die Erklärungen für diese Tatsache sind aber verschieden. Einige Autoren nehmen an, daß durch die Einführung des normalen Bluteerums in kranke Menschen irgendeine fehlende Substanz im Blute ersetzt werde und infolgedessen die Blutgerinnung stattfinde wie in normalem Zustande.

Moll, van der Velden und Angyán konnten zeigen, daß durch parenterale Zufuhr von Pepton oder Serum eine Vermehrung des Fibrinogengehaltes und wahrscheinlich auch des Fibrinfermentes zustandekommt.

Ob aber die normalen Blutsera, wenn sie in normale Menschen- oder Tierkörper eingeführt werden, schon die Blutgerinnung aktiv befördern oder nicht, ist seit langer Zeit eine offene Frage.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich den Fibrinferment-(Trombin)-gehalt und den Fibrinogengehalt vor und nach der Seruminjektion im normalen Tierkörper bestimmt.

Untersuchungsmethode.

Es wurde ausschließlich die Reihenmethode zur Fibrinferment- und Fibrinogenbestimmung nach Wohlgemuth verwendet.

Die Tiere, die man zu diesen Versuchen gebraucht hat, sind folgende:

Standardtiere (für Standardserum und Standardplasma): Meistens Hunde, daneben Kaninchen und Meerschweinchen.
Versuchstiere: Kaninchen, Hunde, Meerschweinchen.
Injektionsserum aus: Kaninchen, Hund, Meerschweinchen, Schwein, Hammel, Rind.

Als Blutplasma wurden meist Magnesiumplasma, einige Male Oxalatplasma angewandt. — Standardserum und Standardplasma wurde direkt vor dem Experimente immer 10 mal verdünnt. Die frischen Tiersera wurden stets durch intravenöse Injektion von 2—12 ccm in den Tierkörper eingeführt, nachdem man eine gewisse Blutmenge für die Untersuchung vor der Seruminjektion entnommen hatte. Danach wurde die Blutentnahme auf sukzessive Weise ausgeführt, und zwar:

1. direkt nach der Injektion,
2. 15 Minuten nach der Injektion,
3. 30 Minuten nach der Injektion,
4. eine Stunde nach der Injektion,
5. 2 Stunden nach der Injektion,
6. 3 Stunden nach der Injektion.

Die Mischungen von Serum und Plasma sind, wie die folgenden Tabellen angeben, angesetzt. Nach vollendeter Mischung wurden die Gemenge in den Eisschrank 24—36 Stunden lang eingelegt und die aufgetretenen Erstarrungen beobachtet.

++++ = komplett erstarrt,
+++ = fast komplett erstarrt,
++ = partiell erstarrt,
\+ = Spur erstarrt.

Experiment 1. Hund Nr. 1, 1400 g (Tabelle I).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Hund) 10 ccm.

Tabelle I A.

Fibrinfermentbestimmung.

	Serum	Standardplasma	vor Injektion	2h nach Injektion
1.	1,0	2,0	++++	++++
2.	0,5	2,0	++++	++++
3.	0,25	2,0	++++	++++
4.	0,125	2,0	++++	++++
5.	0,062	2,0	+++	+++
6.	0,032	2,0	++	++
7.	0,016	2,0	+	+
8.	0,008	2,0	—	—
9.	0,004	2,0	—	—
10.	0,002	2,0	—	—

Tabelle I B. Fibrinogenbestimmung.

	Plasma	Standardserum	vor Injektion	2^h nach Injektion
1.	1,0	2,0	—	—
2.	0,5	2,0	—	—
3.	0,25	2,0	+	+
4.	0,126	2,0	++++	++++
5.	0,062	2,0	+++	+++
6.	0,032	2,0	++	++
7.	0,016	2,0	+	+
8.	0,008	2,0	—	—
9.	0,004	2,0	—	—
10.	0,002	2,0	—	—

Nach dieser Tabelle kann man keinen Unterschied des Fibrinferment- und Fibrinogengehaltes zwischen den Resultaten vor und 2 Stunden nach der Injektion finden.

Experiment 2. Hund Nr. 2, 2200 g (Tabelle II).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Hammel) 10 ccm.

Tabelle II A. Fibrinferment - B (kurz geschrieben).

	vor Injektion	1^h nach Injektion	3^h nach Injektion
1.	++++	++++	++++
2.	++++	++++	++++
3.	++++	++++	++++
4.	+++	++	++
5.	++	++	++
6.	++	++	++
7	+	+	+
8.	—	—	—
9.	—	—	—
10.	—	—	—

Tabelle II B. Fibrinogen - B (kurz geschrieben).

	vor Injektion	1^h nach Injektion	3^h nach Injektion
1.	—	—	—
2.	—	—	—
3.	++	—	++
4.	+++	+++	+++
5.	+++	+++	++
6.	++	++	++
7.	++	++	++
8.	+	++	+
9.	—	+	—
10.	—	—	—

Der Fibrinfermentgehalt ist durch Seruminjektion unverändert.
Der Fibrinogengehalt ist 1 Stunde nach Injektion verdoppelt.

Experiment 3. Kaninchen Nr. 1, 2660 g (Tabelle III).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Hund) 7 ccm.

Tabelle III A.

	vor Injektion	15′ nach Injektion	30′ nach Injektion
1.			
2.	+++	+++	+++
3.	+++	+++	+++
4.	+++	+++	++
5.	+++	++	++
6.	+	+	+
7.	−	−	−
8.	−	−	−

Tabelle III B.

	vor Injektion	15′ nach Injektion	30′ nach Injektion
1.	−	−	−
2.	−	−	−
3.	−	+	−
4.	++	++	+++
5.	+++	+++	+++
6.	++	++	++
7.	+	+	+
8.	−	−	−

Experiment 4. Kaninchen Nr. 2, 2200 g (Tabelle IV).
Standardtier Hammel, Injektionsserum (Autoserum) 6 ccm.
Fibrinfermentgehalt vor und sofort nach der Injektion unverändert.

Tabelle IV.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Injekt.	Direkt n. Injekt.	30′ n. Injekt.	1h n. Injekt.
1.	−	−	−	−
2.	−	+	+	−
3.	++++	+++	++	++++
4.	++	++	++	+++
5.	++	++	++	++
6.	++	+	+	++
7.	+	−	−	+
8.	−	−	−	−

Der Fibrinogengehalt ist sowohl direkt nach Injektion als auch 30 Minuten nach Injektion verringert.

Experiment 5. Kaninchen Nr. 3, 3050 g (Tabelle V).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 5 ccm.

Tabelle V A.
Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Injekt.	Direkt n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.	3h n. Inj.
1.					
2.	++	++	++	++	++++
3.	++	++	++	++	+++
4.	++	++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	+	+	+	+
7.	—	—	—	—	—
8.	—	—	—	—	—

Tabelle V B.
Fibrinogenbestimmung.

	Vor Injekt.	Direkt n. Injekt.	30′ n. Injekt.	1h n. Injekt.
1.	—	—	—	—
2.	—	—	—	—
3.	—	—	—	—
4.	++	++	++	+++
5.	++	+++	+++	+++
6.	++	++	++	++
7.	+	++	+	+
8.	—	+	—	—

Der Fibrinogengehalt direkt nach Injektion verdoppelt.

Experiment 6. Kaninchen Nr. 4, 3500 g (Tabelle VI).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 5 ccm.

Tabelle VI A.
Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Injekt.	Direkt n. Inj.	30′ n. Injekt.	1h n. Injekt.	3h n. Inj.
1.	++	++	+++	++	+++
2.	+++	++++	++++	+++	++++
3.	+++	++++	++++	++++	++++
4.	+++	++++	++++	++++	++++
5.	++	++	++	++	+++
6.	+	+	+	+	+
7.	—	—	—	—	—
8.	—	—	—	—	—

Tabelle VI B.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.	3h n. Inj.
1.	—	++	++	++	++
2.	—	++	++	++	++
3.	—	+++	++	++	++
4.	+++	+++	+	+	++
5.	++	+++	—	—	++
6.	++	++	—	—	+
7.	+	++	—	—	—
8.	—	++	—	—	—
9.	—	+	—	—	—

Experiment 7. Kaninchen Nr. 5, 3000 g (Tabelle VII).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 8 ccm.

Tabelle VII A.

Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.	1h nach Inj.
1.	+++	++++	++++	++++	
2.	+++	++++	+++	+++	+++
3.	++	+++	++	++	+++
4.	++	++	++	++	++
5.	+	+	+	+	+
6	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—

Tabelle VII B.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	—	—	—
4.	++	++	++	++	++
5.	+++	+++	++	+++	++
6.	++	+	++	++	++
7.	+	—	+	+	+
8.	—	—	—	—	—

Experiment 8. Kaninchen Nr. 6, 2300 g (Tabelle VIII).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 8 ccm.

Da der Fibrinfermentgehalt durch Seruminjektion nicht beeinflußt wird, so ist Bestimmung desselben in einigen folgenden Fällen nicht erwähnt.

Tabelle VIII.

Fibrinogenbestimmung (Oxalatplasma).

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.					
2.	—	—	+	+	—
3.	+++	+++	+	+++	—
4.	+++	+++	+	+++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	++	++	++	++	++
7.	+	+	++	+	+
8.	—	—	+	—	—

Experiment 9. Kaninchen Nr. 3 (Tabelle IX).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 7 ccm.

Tabelle IX.

Fibrinogenbestimmung (Oxalatplasma).

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.					
2.	—	—	—	—	—
3.	++	++	—	++	++
4.	++	++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	++	+	+	+
7.	—	+	—	—	—
8.	—	—	—	—	—

Experiment 10. Kaninchen Nr. 2 (Tabelle X).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Kaninchen) 5 ccm.

Tabelle X.

Fibrinogenbestimmung (Oxalatplasma).

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	30′ nach Inj.
1.			
2.	—	—	—
3.	—	—	—
4.	—	—	—
5.	++	++	++
6.	++	++	++
7.	+	++	++
8.		+	+

Experiment 11. Kaninchen Nr. 1 (Tabelle XI).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Auto-) 5 ccm.

Tabelle XI A.

Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1^h n. Inj.
1.					
2.	+++	++	++	+++	+++
3.	+++	+++	+++	+++	++
4.	++	+++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	+	+	+	+
7.	—	—	—	—	—

Tabelle XI B.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	30′ nach Inj.	1^h nach Inj.
1.	—	—	—	—
2.	—	—	—	—
3.	—	—	—	—
4.	++	++	++	++
5.	++	++	++	++
6.	++	++	++	++
7.	+	++	+	+
8	—	+	—	—

Experiment 12. Kaninchen Nr. 5, 1400 g (Tabelle XII).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Kaninchen) 4 ccm.

Tabelle XII.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1^h n. Inj.
1.	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	—	—	—
4.	++++	++++	++++	++++	++++
5.	+++	+++	+++	++++	++++
6.	++	++	++	++	++
7.	+	++	+	+	+
8.	—	+	—	—	—

Experiment 13. Kaninchen Nr. 4 (Tabelle XIII).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Hund) 3 ccm.

Tabelle XIII.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.				
2.	—	—	—	—
3.	—	—	—	—
4.	++++	++++	++++	++++
5.	++++	++++	++++	++++
6.	++	++	++	++
7.	++	++	++	++
8.	+	+	+	+
9.	—	—	—	—

Experiment 14. Kaninchen Nr. 7, 2500 g (Tabelle XIV).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Meerschweinchen) 3 ccm.

Tabelle XIV.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ nach Inj.	1h nach Inj.
1.	—	—	—	—
2.	—	—	—	—
3.	++++	++++	++++	++++
4.	++++	++++	++++	++++
5.	++++	+++	+++	+++
6.	++	+++	++	+++
7.	++	++	++	++
8.	+	+	+	++
9.	—	—	—	—

Experiment 15. Kaninchen Nr. 8, 3500 g (Tabelle XV).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Schwein) 2 ccm.

Tabelle XV.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Inj.
1.	—	—	—
2.	—	—	—
3.	++	++	++
4.	++++	++++	++++
5.	++++	++++	++++
6.	+++	+++	++++
7.	++	++	++
8.	+	++	++
9.	—	+	+

Experiment 16. Kaninchen Nr. 9, 2200 g (Tabelle XVI).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Auto) 10 cm.

Tabelle XVI.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	++	—	—
4.	++++	++++	++++	++++	++++
5.	++	++	+++	+++	++++
6.	+	++	++	++	++
7.	—	++	+	+	+
8.	—	+	—	—	—

Experiment 17. Kaninchen Nr. 5 (Tabelle XVII).
Standardtier Kaninchen, Injektionsserum (Pferd) 12 ccm.

Tabelle XVII.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.
1.	—	—	—	—
2.	—	—	—	—
3.	—	—	—	—
4.	++++	++++	++++	++++
5.	++	++	++	++
6.	++	++	++	++
7.	+	++	++	+
8.		+	+	

Experiment 18. Kaninchen Nr. 10, 3020 g (Tabelle XVIII).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Rind) 12 ccm.

Tabelle XVIII.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.	—				
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	—	—	—
4.	++	—	+++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	++	++	++	++	++
7.	++	++	++	++	++
8.	+	+	+	+	+

Experiment 19. Kaninchen Nr. 11, 3400 g (Tabelle XIX).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Schwein) 4 ccm.

Tabelle XIX.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.					
2.	—	—	—	—	
3.	—	—	—	—	—
4.	++++	++++	++++	—	++++
5.	++	++	++	++	++
6.	++	++	++	++	++
7.	++	++	++	++	++
8.	+	+	+	+	+

Experiment 20. Meerschweinchen Nr. 1, 400 g (Tabelle XX).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Meerschweinchen) 2,5 ccm.

Tabelle XX.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.					
2.	—	—	—	—	—
3.	—	++	++	++	—
4.	++	++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	+	++	+	+
7.			+		

Experiment 21. Meerschweinchen Nr. 2, 600 g (Tabelle XXI).
Standardtier Meerschweinchen, Injektionsserum (Auto-) 2,5 ccm.

Tabelle XXI.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Injektion	Direkt nach Injektion
1.	—	—
2.	++	—
3.	++	++
4.	++	++
5.	+	++
6.	—	++
7.	—	++
8	—	+

Experiment 22. Meerschweinchen Nr. 3, 450 g (Tabelle XXII).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Meerschweinchen) 4 ccm.

Tabelle XXII. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	—	—	—
4.	++	++	++	++	++
5.	+	++	++	++	+
6.	—	+	+	+	—

Experiment 23. Kaninchen Nr. 12, 2500 g (Tabelle XXIII).
Standardtier Hund, Injektionsserum (Pferd) 5 ccm.

Tabelle XXIII. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.				
2.	—	—	—	—
3.	++	++	—	—
4.	+++	++	++	++
5.	++	++	++	++
6.	+	++	+	+
7.	—	+	—	—

Kontrollversuche.

Als Kontrollprobe wurde eine gewisse Menge von 1proz. Peptonwasser, Bouillon, 1proz. Aleuronat-Emulsion (in 1proz. Stärkeaufquellung), 0,01proz. Nucleinsäureemulsion, Eiereiweiß, physiologischer Kochsalzlösung dem Tierkörper intravenös injiziert und der Fibrinferment- und Fibrinogengehalt in gleicher Weise wie in den vorigen Versuchen bestimmt.

Experiment 24. Kaninchen Nr. 6 (Tabelle XXIV).
Standardtier Kaninchen, Injektionsflüssigkeit: Physiolog. Kochsalzlösung 10 ccm.

Tabelle XXIV A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.	+++	++++	+++	++++	++++
2.	+++	+++	+++	+++	+++
3.	++	++	++	++	++
4.	++	++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	+	+	+	+
7.	—	—	—	—	—

Tabelle XXIV B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ n. Inj.	1h n. Inj.
1.					
2.	—	—	—	—	—
3.	++++	++++	+++	++++	+++
4.	++++	++++	++++	+++	++++
5.	+++	+++	+++	+++	+++
6.	++	++	++	++	++
7.	+	+	+	+	+

Experiment 25. Kaninchen Nr. 2 (Tabelle XXV).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: 1 proz. Peptonwasser 10 ccm.

Tabelle XXV A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ nach Inj.	1h n. Inj.
1.	+++	+++	+++	+++	+++
2.	+++	+++	+++	+++	+++
3.	++	++	++	++	++
4.	++	++	++	++	++
5.	++	+	+	++	++
6.	++			++	++
7.	+			+	+

Tabelle XXV B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ nach Inj.	1h nach Inj.
1.	—	—	—	—	—
2.	—	—	—	—	—
3.	—	—	++++	—	++
4.	++	++	++++	++	+++
5.	++	++	++	++	++
6.	++	++	++	++	++
7.	++	++	++	++	++
8.	+	+	+	+	+

Experiment 26. Kaninchen Nr. 4 (Tabelle XXVI).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: 1 proz. Aleuronatemulsion 3 ccm.

Tabelle XXVI A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Injektion
1.	++++	+++	++++
2.	+++	+++	+++
3.	++	++	++
4.	+++	+++	+++
5.	++	++	++
6.	++	++	++
7.	+	+	+

Tabelle XXVI B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Injektion
1.			
2.	—	—	—
3.	—	++	++++
4.	+++	+++	+++
5.	++	++	++
6.	++	++	++
7.	++	++	++
8.	+	+	+

Experiment 27. Kaninchen Nr. 2 (Tabelle XXVII).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: 1 proz. Peptonwasser 7 ccm.

Tabelle XXVII A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Injektion
1			
2.	+++	+++	++
3.	++	++	++
4.	++	++	++
5.	++	+	+
6.	++		
7.	+		

Tabelle XXVII B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Injektion	Direkt nach Injektion	15′ nach Injektion
1.	—	—	—
2.	—	—	—
3.	—	—	—
4.	—	—	—
5.	++	+++	++
6.	++	++	++
7.	++	++	++
8.	+	+	+

Experiment 28. Kaninchen Nr. 6 (Tabelle XXVIII).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigk.: 0,01 proz. Nucleinsäureemuls. 3 ccm.

Tabelle XXVIII A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Injektion	Direkt nach Injektion	15′ nach Inj.
1.			
2.	++++	++++	+++
3.	+++	+++	++
4.	++	++	++
5.	++	++	++
6.	++	++	++
7.	++	++	++
8.	+	+	++
9.			+

Tabelle XXVIII B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Injektion	Direkt nach Injektion	15′ nach Inj.
1.			
2.	–	–	–
3.	++	++	++
4.	++++	++++	++++
5.	++	++	+++
6.	++	++	++
7.	++	++	++
8.	+	+	+

Experiment 29. Kaninchen Nr. 1 (Tabelle XXIX).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: 0,01 proz. Nucleinsäureemulsion 5 ccm.

Tabelle XXIX A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ nach Inj.	1^h nach Inj.
1.					
2.	+++	+++	++++	+++	+++
3.	+++	+++	++	+++	++
4.	++	++	++	++	++
5.	++	++	++	++	++
6.	+	++	++	+	+
7.		+	+		

Tabelle XXIX B. Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ n. Inj.	30′ nach Inj.	1^h n. Inj.
1.					
2.	–	–	–	–	–
3.		–	–	–	–
4.		++	++	++	++
5.		++	++	++	++
6.		+	+	+	+
7.					

Experiment 30. Kaninchen Nr. 2 (Tabelle XXX).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: Eiereiweiß 5 ccm.

Tabelle XXX A. Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.	+++	+++	+++	++
2.	++	++	++	++
3.	++	++	++	++
4.	++	++	++	++
5.	+	+	+	+

Tabelle XXX B.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.				
2.	–	–	–	–
3.	–	–	–	–
4.	++	++	++	++
5.	++	++	++	++
6.	+	+	+	+

Experiment 31. Kaninchen Nr. 4 (Tabelle XXXI).
Standardtier Hund, Injektionsflüssigkeit: Bouillon 4 ccm.

Tabelle XXXI A.

Fibrinfermentbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt nach Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.				
2.	+++	+++	+++	+++
3.	+++	+++	+++	+++
4.	++	++	++	++
5.	++	++	++	++
6.	++	++	++	++
7.	+	+	+	+

Tabelle XXXI B.

Fibrinogenbestimmung.

	Vor Inj.	Direkt n. Inj.	15′ nach Inj.	30′ nach Inj.
1.				
2.	–	–	–	–
3.	+++	–	–	++
4.	+++	++	+++	+++
5.	++	++	++	++
6.	++	++	++	++
7.	+	+	+	+

Wie die zuvor aufgeführten Experimente zeigen, hat die Seruminjektion in normale Tierkörper gewisse Einflüsse auf die Blutgerinnung, und zwar in der Weise, daß der Fibrinogengehalt nach der Injektion in den meisten Fällen vergrößert wird, während der Fibrinfermentgehalt immer unverändert bleibt.

Die Zunahme des Fibrinogengehaltes erfolgt fast konstant nach Injektion von Autoserum oder Serum einer gleichen Tierart (Ausnahme Exp. 4 und 7), aber inkonstant nach Injektion

von Serum einer anderen Tierart. Die Fibrinogenmenge steigt nach der Injektion meist auf das doppelte Quantum, ab und zu auf das vier- und sogar sechsfache, und zwar besonders nach Injektion von Autoserum und Serum der gleichen Tierart. Diese Zunahme tritt meist direkt nach der Injektion, selten 15 Minuten nach der Injektion auf. Die Dauer dieser Zunahme ist ganz kurz. Nach höchstens 15 Minuten, in seltenen Fällen 30 Minuten, erreicht der Fibrinogengehalt wieder seinen normalen Wert oder ist seinem normalen Werte nahe.

Aus Kontrollversuchen kann man schließen, daß die oben beschriebenen Injektionsmaterien nie eine gleiche Wirkung wie die normalen Tiersera haben. Sie haben keine Einflüsse auf den Fibrinogengehalt.

Auf Peptonwasserinjektion folgt die Abnahme der Fibrinfermente (Exp. 25 und 26), während nach der Nucleinsäureinjektion die Fibrinfermente zunehmen (Exp. 28 und 29).

Schlüsse.

1. Nach Seruminjektion in normale Tierkörper tritt meist die Zunahme des Fibrinogengehalts ein, und zwar fast konstant bei Anwendung von Autoserum oder Serum der gleichen Tierart.
2. Die Fibrinogenzunahme erfolgt fast immer direkt nach der Injektion oder 15 Minuten nach derselben und dauert höchstens 15—30 Minuten.
3. Diese fibrinogenvermehrende Wirkung ist wahrscheinlich eine spezifische Kraft des Tierserums, die durch gewöhnliche Eiweißpräparate oder einige andere Reagenzien nicht ersetzt werden kann.

Zum Schluß spreche ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Mita, für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank aus.

Literatur.

J. v. Angyán und von der Velden, diese Zeitschr. 43, Heft 3. — Baum, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. 1909. — Bersche, Berl. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 35. — Biedl und Kraus, Wien klin. Wochenschrift 1909, Nr. 11. — Bienwald, Dtsch. med. Wochenschr. 1894. — Bonzani, Riforma med. 1908, Nr. 17. — Broca, Med. Klin. 1907. —

Carriere, IX. franz. Kongr. f. inn. Med. 1907. — Czerny und Keller, Soc. d'obstet. de Paris. — Eligaceray, Thèse de Paris 1907. — R. Franz, Zentralbl. f. Gynäkol. 1912, Nr. 28. — Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 53. — Friedberger, Berl. klin. Wochenschr. 1909, Nr. 36. — Goodmann, Amer. journ. of surg. 1910. — Labbé, Rev. de med. 1908. — Moll, Wien. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 44. — P. Morawitz und J. Lossen, Dtsch. Archiv f. klin. Med. 94, Heft 1/2. — W. R. Nicholson, Therap. Gaz. 1912, Nr. 35. — Orlowski, Thèse de Paris 1897. — Perthes, Dtsch. med. Wochenschr. 1905. — L. Plumier, Le Scalpel 10, VI. 1910. — H. Sahli, Zeitschr. f. klin. Med. 56. 1905. — Scheidemantel, Münch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 43. — Trembour, Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. 1909. — L. Unger, Wien. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 39. — R. von der Felden, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 8, Heft 3/4. — E. Weil, Bull. et mém. de la Soc. des hôp. d. Paris, Okt. 1906 und Jan. 1907. — Zoege von Manteuffel, Dtsch. med. Wochenschr. 1893.

Beiträge zur biochemischen Erkennung von Atropin.

Von

Tokuji Togawa.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 11. Mai 1920.)

Es ist eine erwiesene Tatsache, daß die Vitaminpräparate, wenn sie in bestimmter Menge dem Tiere intravenös eingespritzt werden, eine sofortige speicheltreibende Wirkung haben. Nach einer solchen Injektion fließt nämlich der Speichel in langen Fäden aus dem Munde des Tieres[1]). Mit dem Speichelfluß läßt sich auch eine Vermehrung der Nasensekretion und der Tränenabsonderung feststellen. Das Tier zeigt momentan etwas Unruhe, bleibt dann aber normal. Die Wirkung dauert einige Minuten, um dann allmählich abzuklingen.

Als ein merkwürdiges Phänomen kann es bezeichnet werden, daß obige Vitaminwirkung durch eine Spur Atropin ($^4/_{100}$ Milligramm pro Tier genügen schon) ganz aufgehoben ist, wenn dasselbe dem Tiere vorher injiziert wurde, wie C. F. Traczewski als erster festgestellt hat.

Es wäre eine interessante Tatsache, wenn diese antagonistische Wirkung von Atropin gegen Vitamin auch bei Vorhandensein von anderen Alkaloiden der zweiten Gruppe nach Stas-Otto, wie Nicotin, Coniin, Veratrin, Narkotin, Thebain, Kodein, Papaverin, Pilocarpin, Brucin, Strychnin, Aconitin, Cocain, Delphinin, Emetin, Physostigmin, Colchicin, Digitalin, Apomorphin usw. erzielt werden könnte. Um diese Frage zu lösen, führte ich folgende Arbeit aus.

Als Vitaminpräparat wandte ich „Orypan" an, weil uns seine minimale, speicheltreibend wirkende Dosis schon bekannt ist (ca. 5 ccm pro gewöhnliches Tier), und daneben, nach genauer Betrachtung seiner physiologischen Wirkung, noch „Haferextrakt".

[1]) Fr. Uhlemann, Zeitschr. f. Biologie 68, 1918.

Die Lösung von Atropinum sulfuricum Merk wurde immer frisch hergestellt. Als Versuchstiere benutzte ich hauptsächlich Kaninchen.

Experiment 1. Kaninchen Nr. 1, 1900 g.

7. VII. 0,004 proz. Atropinlösung und 50 proz. Orypan-Ringerlösung frisch hergestellt.

Orypan-Ringer ca. 18 ccm intravenös injiziert, sofort Speichelfluß ca. 4 ccm (6 Minuten lang).

Kaninchen Nr. 2, 1350 g.

7. VII. 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm vorher, dann 50 proz. Orypan 10 ccm intravenös eingespritzt. Kein Speichelfluß.

Experiment 2. Kaninchen Nr. 1.

7. VII.	0,004 proz. Coninlösung	1,0 ccm	gemischt intravenös injiziert.
	0,004 proz. Atropinlösung	1,0 ccm	

50 proz. Orypan 10 ccm nachher auch intravenös injiziert.

Sofortiges Auftreten von deutlicher Cyanose, an Gesichtszentrum und Ohren sichtbar. Tier etwas unruhig, Pupillen verkleinert, aber kein Speichelfluß.

Experiment 3. A. Kaninchen Nr. 1.

8. VII.	0,01 proz. Physostigmin	0,1 ccm ($^1/_{100}$ mg)	intravenös.
	0,004 proz. Atropin	1,0 ccm	
	50 proz. Orypan	10 ccm	

Kein Speichelfluß.

B. Kaninchen Nr. 2, 1850 g.

8. VII.	0,01 proz. Physostigmin	0,4 ccm ($^4/_{100}$ mg)	intravenös.
	0,004 proz. Atropin	1,0	
	50 proz. Orypan	10 ccm	

Kein Speichelfluß.

Experiment 4. Kaninchen Nr. 3, 1350 g.

8. VII.	0,004 proz. Pilocarpin	1,0 ccm	intravenös.
	0,004 proz. Atropin	1,0 ccm	
	50 proz. Orypan	10 ccm	

Kein Speichelfluß.

Experiment 5. Kaninchen Nr. 2.

9. VII.	0,004 proz. Nicotin	1,0 ccm	intravenös.
	0,004 proz. Atropin	1,0 ccm	
	50 proz. Orypan	10,0 ccm	

Kein Speichelfluß.

Experiment 6. Kaninchen Nr. 3.

9. VII.	0,004 proz. Brucin	1,0 ccm	intravenös.
	0,004 proz. Atropin	1,0 ccm	
	50 proz. Orypan	10,0 ccm	

Kein Speichelfluß.

Experiment 8. (Versuch mit Haferextrakt.)

18. VII. A. Kaninchen, 1330 g.

50 proz. Haferextrakt 10 ccm intravenös injiziert, sofort Tod unter Atemstillstand.

B. Kaninchen, 2230 g.

50 proz. Haferextrakt 6 ccm intravenös injiziert. Das Tier vertrug diese Dosis und der Speichelfluß ca. 2 ccm trat auf (6 Minuten lang).

C. Kaninchen 1350 g.

20 proz. Haferextrakt 10 ccm intravenös, sofort geringer Speichelfluß.

Experiment 9. Kaninchen Nr. 1, 1700 g.

20. VII. 0,004 proz. Veratrin-Alkohol-Wasser-Lösung 1,0 ccm, 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm, 50 proz. Haferextrakt 6,0 ccm } intravenös.

Kein Speichelfluß.

Shockerscheinung direkt nach der Injektion; während der Nacht ist das Tier gestorben.

Autopsie: Leichte Trübung der beiden Nieren und geringe Stauung der beiden Lungen.

Experiment 10. Kaninchen Nr. 4, 1450 mg.

20. VII. 0,004 proz. Codeinum phosphoric. 1,0 ccm, 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm, 25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm } intravenös.

Kein Speichelfluß.

Experiment 11. Kaninchen Nr. 6, 1900 g.

22. VII. 0,004 proz. Colchicin 1,0 ccm, 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm, 25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm } intravenös.

Kein Speichelfluß.

Experiment 12. Kaninchen Nr. 7, 1580 g.

22. VII. 0,004 proz Digitalin 1,0 ccm, 0,004 proz Atropin 1,0 ccm, 25 proz Haferextrakt 10.0 ccm } intravenös.

Nach einer Stunde ist das Tier gestorben, keine deutlichen pathologisch-anatomischen Befunde.

Experiment 13. A. Kaninchen Nr 8, 1850 g

22. VII. 0,004 proz. Aconitin. nitric. 1,0 ccm, 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.

Sofort nach der Injektion Atemstillstand.

B. Kaninchen Nr. 6.

25 proz. Haferextrakt. 10,0 ccm, 0,004 proz. Aconitin 0,5 ccm, 0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös

Kein Speichelfluß.

Experiment 14. Kaninchen Nr. 4.

22. VII. 0.004 proz. Apomorphin. hydrochloric. 1,0 ccm
0,004 proz Atropin 1,0 ccm } intravenös.
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 15. Kaninchen Nr. 4.

24. VII. 0,004 proz. Narcotin. chlorhydrat. 1,0 ccm
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 16. Kaninchen Nr. 9, 1780 g.

24. VII. 0,004 proz. Delphinin-Alkohol-Wasserlösung 1,0 ccm
(mit einigen Tropfen HCl angesäuert und
mit Natronlauge fast ganz neutralisiert) } intravenös.
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 17. Kaninchen Nr. 10, 1550 g.

18. VIII. 0,004 proz. Thebain 1,0 ccm
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.
20 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 18. Kaninchen Nr. 11, 1450 g.

18. VIII. 0,004 proz. Papaverin. hydrochloric 1,0 ccm
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 19. Kaninchen Nr. 10.

19. VIII. 0,004 proz. Cocain. hydrochloric. 1,0 ccm
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Experiment 20. Kaninchen Nr. 11.

20. VIII. 0,004 proz. Emetin 1,0 ccm
0,004 proz. Atropin 1,0 ccm } intravenös.
25 proz. Haferextrakt 10,0 ccm

Kein Speichelfluß.

Aus den oben erwähnten Versuchen ist leicht ersichtlich, daß die Atropin-Orypan-Reaktion von keinen anderen Alkaloiden der zweiten Gruppe des Stas-Ottoschen Analysenganges beeinflußt wird und als eine neue Prüfungsmethode von Atropin besonders für das gerichtlich-medizinische Verfahren empfohlen werden kann.

Blutgasanalysen. V.

Der Einfluß der Erdalkalien auf Hämoglobin und Zellkolloide.

Von

H. Straub und Kl. Meier.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität München und der medizinischen Poliklinik der Universität Halle a. S.

(Eingegangen am 4. Juni 1920.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Seit langem ist es bekannt, daß das Hämoglobin in deutlich alkalischen Lösungen als Säure auftritt, daß es bei Verminderung der Basizität der Lösung die Eigenschaften einer Säure verliert und schließlich in deutlich saurer Lösung die Eigenschaften einer Base bekommt. Man hatte früher diese Beobachtung dadurch erklärt, daß man Hämoglobin als Ampholyten auffaßte, der in basischer Lösung ein Wasserstoffion abdissoziiert und so die Eigenschaften einer Säure entfaltet. Mit Zufügung von Säure zur Lösung wird nach dieser Auffassung die Säuredissoziation des Hämoglobins zurückgedrängt, bis schließlich das Hämoglobin mehr und mehr Hydroxylionen abdissoziiert, wodurch es die Eigenschaften einer Base bekommt. Der ganze Vorgang geschieht ohne sprungweise Zustandsänderung in ganz allmählichem Übergang. Der Säuregrad, bei dem eine beschränkte und gleich große Anzahl von Hämoglobinmolekülen Wasserstoffionen und Hydroxylionen abgespalten haben und bei dem gleichzeitig die Hauptmasse der Hämoglobinmoleküle weder in der einen noch in der andern Form dissoziiert, sondern elektrisch ungeladen in der Lösung enthalten ist, heißt isoelektrischer Punkt des Hämoglobins. Er wurde von Michaelis[1]) durch Kataphorese bestimmt und liegt bei der Wasserstoffzahl $p_H = 6{,}74$.

---

[1]) L. Michaelis u. H. Davidson, diese Zeitschr. **41**, 102. 1912.

Als wir nun[1]) bei unseren Blutgasanalysen diesen Vorgang der Entladung und Umladung des Hämoglobins, d. h. seines Übergangs von sauren zu basischen Eigenschaften quantitativ verfolgten, kamen wir zu der Überzeugung, daß die geschilderte, bisher allgemein anerkannte Vorstellung mit den Tatsachen unvereinbar sei. Wenn wir die Acidität der Lösung durch Zutitrieren von Kohlensäure, also einer sehr schwachen Säure, ganz allmählich änderten und dabei das Kohlensäurebindungsvermögen der Lösung beobachteten, so fanden wir, daß sich die Lösung so verhielt, als ob das Hämoglobin eine starke Säure wäre, deren Salze in der Lösung ganz oder jedenfalls vorwiegend dissoziiert sind. Dieser Zustand blieb unverändert bestehen bis zu dem Augenblick, in dem durch Zufügen ausreichender Kohlensäuremengen die Wasserstoffzahl $p_H = 7{,}00$ erreicht wurde. In diesem Augenblick zeigte die Kohlensäurebindungskurve plötzlich eine Unstetigkeit. Sie bog in scharfem Knick aus ihrem ursprünglichen Verlauf ab und folgte einer Linie, die nach unserer Überzeugung der Wasserstoffzahl $p_H = 7{,}00$ entspricht. Wenn dann im Verlauf dieser Linie so viel Kohlensäure mehr aufgenommen ist, daß pro Mol Hämoglobin ein Mol Kohlensäure gebunden ist, dann nahm die Kohlensäurebindungskurve mit einer neuen Unstetigkeit die ursprüngliche Richtung wieder auf. Nach unserer Meinung konnte diese Beobachtung nur so gedeutet werden, daß das Hämoglobin bei der ganz scharf bestimmten Wasserstoffzahl $p_H = 7{,}00$ plötzlich seine negative elektrische Ladung, die ihm Säureeigenschaften verleiht, verliert und elektrisch neutral wird. Die Wasserstoffzahl 7,00 kann nicht überschritten werden, ehe alle Hämoglobinmoleküle ihre Ladung verloren haben. Wir waren uns bewußt, daß es bisher keine Analogie für diesen von uns angenommenen Vorgang gibt und daß es immer mißlich ist, bei einem Naturvorgang eine wirkliche Unstetigkeit, eine sprungweise Zustandsänderung anzunehmen, die wohl nur unter der Annahme eines Umbaus in der inneren Anordnung des Hämoglobins verstanden werden kann. Allein wir sahen keine Möglichkeit, unsere Beobachtungen auf andere Weise zu deuten. Und ähnliche Unstetigkeiten sind doch auch sonst in der Natur bekannt, z. B. beim Übergang in einen andern Aggregatzustand.

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305. 1918.

Bei der großen Schwierigkeit der Deutung unserer Befunde, die uns ja auch bezüglich des zugrunde gelegten Vorgangs vor ein von uns nicht gelöstes Rätsel stellen, begrüßen wir es sehr, daß ein auf diesem Gebiete so besonders erfahrener Forscher wie L. Michaelis[1]) unsere Überlegungen nachgeprüft hat. Wir erhoffen von einer Besprechung dieser Fragen eine weitere Klärung des schwierigen Gebietes auch dann, wenn wir nicht in der Lage sind, uns die von Michaelis vorgetragenen Anschauungen zu eigen zu machen. Bei der prinzipiellen Bedeutung der Frage scheint es uns notwendig, das Problem nochmals eingehend zu besprechen.

Das von uns zur Bestimmung der Wasserstoffzahl unserer Lösungen benützte Verfahren von Hasselbalch[2]) beruht auf dem Massenwirkungsgesetz, das in seiner einfachsten Form für Lösungen von Kohlensäure in Wasser lautet: $\frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} = K$ (Gleichung 1). Nach dieser Gleichung läßt sich die Wasserstoffzahl $[H^+]$ berechnen, wenn die scheinbare Dissoziationskonstante[3]) der Kohlensäure bekannt ist und die Konzentration der freien ($[CO_2]$) und der dissoziierten ($[HCO_3^-]$ Kohlensäure bestimmt wird, die später in der Form der „gebundenen" Kohlensäure in Salzlösungen wiederkehrt. Die Konzentration der freien Kohlensäure wird aus dem Kohlensäuredruck der Atmosphäre bestimmt, mit der sich die Lösung in Gleichgewicht befindet, die dissoziierte (gebundene) Kohlensäure durch Gasanalyse, die die gesamte in der Lösung enthaltene Kohlensäure ($[CO_2] + [HCO_3^-]$) zu ermitteln gestattet. Um die Gleichung aufzulösen, ist also die Kenntnis des Absorptionskoeffizienten α der Kohlensäure in der Lösung und die Kenntnis der Dissoziationskonstanten der Kohlensäure erforderlich. Unter Kenntnis dieser Konstanten kann man in einem Koordinatensystem, in dem die durch Gasanalyse ermittelten Volumprozente der in der Lösung enthaltenen Kohlensäure als Ordinaten, die Kohlensäurespannung als Abszisse eingetragen ist, ein Liniensystem ziehen, das strahlenförmig vom

---

[1]) L. Michaelis, Über die Analyse des CO_2-Gleichgewichts im Blute nach H. Straub und Kl. Meier. Diese Zeitschr. **103**, 53. 1920.

[2]) K. A. Hasselbalch, diese Zeitschr. **78**. 112. 1916.

[3]) Vgl. L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914. S. 12.

Koordinatenanfangspunkt ausgeht und geradlinig verläuft. Solche Linien verbinden in dem einfachen Fall der Kohlensäure in wässeriger Lösung Punkte, an denen die gleiche Wasserstoffzahl herrscht (geometrische Lösung obiger algebraischer Gleichung 1). Wir haben in unserem Koordinatensystem Linien nach dem geschilderten Prinzip eingetragen und sie als Linien gleicher Wasserstoffzahl bezeichnet. Michaelis[1]) schlägt für dieses Liniensystem den Namen Isohydren vor, wir möchten aber lieber bei unserer etwas umständlicheren Ausdrucksweise bleiben, die wir mit Vorbedacht nicht gekürzt haben, um verständlich zu bleiben.

Die Verhältnisse werden verwickelter, wenn neben der Kohlensäure auch noch kohlensaure Salze in Lösung sind. Obige Gleichung (1) bleibt zu Recht bestehen. Aber es ist jetzt nicht mehr die gesamte „gebundene Kohlensäure" als Bicarbonation in Lösung, sondern ein Teil als undissoziiertes Alkalibicarbonat. In welchem Verhältnis sich die gebundene Kohlensäure auf Ionen und undissoziiertes Bicarbonat verteilt, hängt von der Natur der Basen und von der Salzkonzentration ab. Neben der Gleichung (1) gilt also jetzt für die Lösung auch die weitere Gleichung $\frac{[HCO_3^-]}{[HCO_3^-] + [Alk\,HCO_3]} = \delta$ (2), wobei δ den Dissoziationsgrad der in Lösung befindlichen Alkalibicarbonate, d. h. das Verhältnis der Bicarbonationen $[HCO_3^-]$ zu der gesamten gebundenen Kohlensäure $[HCO_3^-]$ + [undissoziiertes Alkalibicarbonat] bedeutet. Um aus den Bestimmungen der Kohlensäurespannung und des Volumprozentgehaltes an Kohlensäure die Wasserstoffzahl nach Gleichung (1) zu berechnen, ist also jetzt noch die Kenntnis des Dissoziationsgrades δ der in der Lösung enthaltenen Bicarbonate erforderlich. Die Base, mit der im Blute Bicarbonate gebildet werden, besteht hauptsächlich aus Natrium, in geringeren Mengen aus Kalium, Calcium und vielleicht aus Eiweißstoffen. Solange es sich um die starken Basen Natrium, Kalium, Calcium handelt, kann der Dissoziationsgrad einheitlich aufgefaßt werden. Er beträgt im Blute ungefähr 0,8. Hasselbalch hat den Dissoziationsgrad der im Blute enthaltenen Bicarbonate übereinstimmend mit reinen Bicarbonatlösungen gefunden, in solchen Bicarbonatlösungen genauer er-

[1]) L. Michaelis, diese Zeitschr. **103**, 54. 1920.

mittelt und daraus eine Formel aufgestellt, die Gleichung (1) und (2) verbindet und die Berechnung der Wasserstoffzahl gestattet. Unsere etwas gekrümmt verlaufenden Linien gleicher Wasserstoffzahl sind nach dieser Gleichung Hasselbalchs berechnet. Durch Vergleich mit direkten Bestimmungen der Wasserstoffzahl mit Hilfe der Gaskette hat Hasselbalch nachgewiesen, daß seine Überlegung für die komplizierte Blutlösung Geltung besitzt.

Die Richtigkeit unserer Linien gleicher Wasserstoffzahl hängt also davon ab, wie genau der Absorptionskoeffizient α der Kohlensäure und der Dissoziationsgrad δ der Bicarbonate bekannt ist. Sind die von Hasselbalch angegebenen Größen dieser Konstanten für die von uns untersuchten Verhältnisse nicht genügend genau, so wird sich daraus eine kleine Verschiebung unserer Linien gleicher Wasserstoffzahl ergeben. Für die prinzipielle Deutung unserer Versuche sind solche möglicherweise notwendigen kleinen Korrekturen belanglos. Es liegt uns aber daran, alle Fehlermöglichkeiten rückhaltlos darzustellen. Michaelis[1]) wendet nun ein, daß der leicht gekrümmte Verlauf unserer Linien den Tatsachen nicht ausreichend Rechnung trägt, weil der Dissoziationsgrad δ nicht nur von der Bicarbonatkonzentration, sondern von der Konzentration aller in Lösung befindlichen Salze abhängt. Wir halten diesen Einwand gegen die Darstellung Hasselbalchs im Prinzip für berechtigt und glauben, daß dadurch unsere Linien in ihrem stärker gekrümmten Teil eine kleine Abänderung erfahren müßten. Da wir aber den genauen Grad der notwendigen, vermutlich nicht sehr bedeutenden Korrektur nicht kennen, behalten wir bis auf weiteres unsere bisherigen, nach der ursprünglichen Gleichung Hasselbalchs gezogenen Linien bei. Praktisch ist der Einwand Michaelis' fast vollkommen belanglos, weil der erste, etwas gekrümmte Teil des Liniensystems für die Bestimmungen kaum Verwendung findet. Darauf hat auch Michaelis schon hingewiesen.

Michaelis glaubt nun trotz unserer Kurven an seiner ursprünglichen Vorstellung vom Hämoglobin als einem Ampholyten festhalten zu können, indem er annimmt, daß für die von uns untersuchten Verhältnisse unser Liniensystem nicht mehr Linien gleicher Wasserstoffzahl verbinde, weil die Bestimmung des

[1]) L. Michaelis, diese Zeitschr. **103**, 54. 1920.

Dissoziationsgrades δ versage. Die Wasserstoffzahl $p_H = 7{,}00$ herrsche nur am Beginn des von uns gefundenen Knicks der Kohlensäurebindungskurve, am Schlusse des Knicks sei p_H nicht = 7,00, wie wir meinen, sondern „wahrscheinlich" = 6,53. Der Einwand von Michaelis erscheint uns so wichtig, daß wir uns seine Möglichkeit von allen Seiten überlegt haben.

Die von uns festgestellte Tatsache, daß in dem von uns gefundenen „Knick" pro Mol Hämoglobin ein Mol Kohlensäure gebunden wird, deutet Michaelis in der Weise, daß die Kohlensäure nun nicht mehr nur als Natriumbicarbonat gebunden werde, sondern auch als Hämoglobinbicarbonat. Hämoglobin betrachtet Michaelis in diesem Zusammenhang als schwache Base und schließt daraus, daß das Hämoglobinbicarbonat als Salz einer schwachen Base mit einer schwachen Säure anders dissoziiere als Natriumbicarbonat, d. h. daß es vorwiegend in undissoziierter Form vorhanden sei. Der Dissoziationsgrad δ ist dann natürlich ein anderer als für das Natriumbicarbonat. Die gebundene Kohlensäure besteht dann nicht mehr nur aus $[HCO_3^-] + [NaHCO_3]$, sondern es kommt dazu noch undissoziiertes $[Hb—HCO_3]$.

Nehmen wir diese Überlegung von Michaelis als richtig an und verfolgen sie quantitativ an der Hand unserer Kurven! Wir legen den extremsten Fall zugrunde, daß alles Hämoglobinbicarbonat undissoziiert sei. Dann brauchen wir dieses nur von der gesamten gebundenen Kohlensäure abzuziehen und können dann wieder aus den Gleichungen (1) und (2) die nunmehr richtige Wasserstoffzahl berechnen. Die Menge des möglicherweise auftretenden Hämoglobinbicarbonats ist aus dem Kurvenverlauf d. h. aus der Höhe der durch den Knick bedingten Stufe, und aus den in der Lösung jedesmal vorgenommenen Hämoglobinbestimmungen gleichermaßen bekannt. Führen wir diese Berechnung in Abb. 1, Kurve 1 unserer früheren Mitteilung[1]) aus! Der Knick beginnt in diesem Versuche bei der Kohlensäurespannung 92 und der Kohlensäurekapazität 60%. Hier herrscht die Wasserstoffzahl 7,00. Der Knick endigt bei der Kohlensäurespannung 122 mit 80 Volum-% Kohlensäurekapazität. Ziehen wir die während des Knicks mehr gebundenen 17,5 Volum-% Kohlensäure als „Hämoglobinbicarbonat" ab, so sind am Ende

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. **90**, 305. 1918.

des Knicks noch 62,5 Volum-% Kohlensäure als Natriumbicarbonat in Lösung. Durch Anbringung dieser Korrektur erhalten wir demnach am Ende des Knicks als äußersten nach der Annahme von Michaelis überhaupt möglichen Wert die Wasserstoffzahl 6,89, der sich nur verhältnismäßig wenig von dem von uns angenommenen Werte 7,00 unterscheidet und weit von dem Werte 6,53 entfernt bleibt, den Michaelis an dieser Stelle (NB. ohne rechnerische Begründung!) vermutet und notwendig braucht, wenn seine Auffassung richtig sein soll. Führen wir dieselbe Berechnung ebenso für die viel tiefer liegende Kurve 5 derselben Abbildung durch, so erhalten wir für den Endpunkt des Knicks statt der von uns angenommenen Wasserstoffzahl 7,00 den Wert 6,67, der sich dem von Michaelis vermuteten Wert nähert, aber ihn nicht erreicht. Ist mit dieser Betrachtungsweise etwas gewonnen? Nach unserer Annahme liegt der Endpunkt des Knicks in allen Fällen bei der Wasserstoffzahl 7,00, unter Zugrundelegung der von Michaelis geforderten Korrektur je nach Lage der Kurve bald bei 6,89, bald bei 6,67, niemals aber bei dem geforderten Werte 6,53. An Stelle der Gesetzmäßigkeit tritt damit Willkür, an Stelle der Ordnung Unordnung, ohne daß doch die Tatsachen mit den Forderungen der Theorie in Einklang zu bringen wären. Da wir die genaueren, hochliegenden Kohlensäurebindungskurven unseren Überlegungen vorwiegend zugrunde legen müssen, bleiben wir von dem von Michaelis geforderten Werte der Wasserstoffzahl am Ende des Knicks weit entfernt, so weit, daß keine Möglichkeit der Versöhnung besteht. Dies ist der erste Grund, weshalb wir die von Michaelis vorgeschlagene Lösung für unmöglich halten.

Um unsere Beobachtungen mit seiner Theorie in Einklang zu bringen, braucht Michaelis ferner unbedingt notwendig den Satz (l. c. S. 57): „Natürlich wird sich bei genügend genauer Messung der Knick zu einer etwas sanfteren Kurve abrunden, und man kann keinesfalls wirkliche Unstetigkeiten erwarten.“ Zu Beginn unserer Untersuchungen standen auch wir selbstverständlich auf diesem Standpunkte. Wir waren uns bewußt, daß die Fehlerbreite unserer Methode eine recht erhebliche ist. Da nun außerdem häufig kein tatsächlich bestimmter Punkt genau in den Ecken des Knicks lag, versuchten wir diese Ecken abzurunden. Wir verfügen aber jetzt über mehrere hundert

Kohlensäurebindungskurven, in denen der Knick verfolgt wurde. Darunter sind recht zahlreiche, in denen ein bestimmter Punkt genau in der Ecke des Knicks oder nahe dieser liegt. Was aus einer Kurve nicht geschlossen werden darf, glauben wir auf Grund unseres sehr großen Materials mit Bestimmtheit behaupten zu dürfen. Es ist nach den tatsächlich bestimmten Werten unmöglich, die Ecken des Knicks nennenswert abzurunden. Die weniger wahrscheinliche Möglichkeit allein entspricht den Tatsachen, im kurvenanalytischen Sinne besteht tatsächlich eine Unstetigkeit an Anfang und Ende des Knicks. Dies ist der zweite Grund, weshalb wir die Annahme von Michaelis nicht als richtig anerkennen können.

Bei alkalischerer Reaktion als $p_H = 7{,}00$ ist Hämoglobin eine Säure, es zeigt entsprechend seiner negativen Ladung anodische Konvektion. Nach der Vorstellung von Michaelis ist es eine schwache Säure, deren Dissoziation mit Zunahme des Säuregrades der Lösung mehr und mehr zurückgedrängt wird. Die genaue Dissoziationskonstante der Säure Hämoglobin ist nicht bekannt, nach den Vorstellungen von Michaelis kann sie aber nicht allzuweit von der Dissoziationskonstanten der Kohlensäure oder der zweiten Dissoziationskonstanten der Phosphorsäure entfernt sein. Setzen wir also dem Serum gelöstes Hämoglobin zu, so tun wir nach der Vorstellung von Michaelis in physikalisch-chemischem Sinne ziemlich genau dasselbe, wie wenn wir dem Serum primäres Phosphat zusetzen. Die Kohlensäurebindungskurve von Serum + gelöstem Hämoglobin muß dann im Prinzip ebenso verlaufen wie die von Serum + Phosphorsäure. Den Versuch mit Zusatz von Phosphorsäure zu Serum haben wir früher[1]) ausgeführt (Abb. 2 der früheren Mitteilung). Charakteristisch für die Kohlensäurebindungskurve nach Phosphorsäurezusatz ist der ganz allmähliche Anstieg, der stets steiler bleibt als die Linie rein physikalischer Absorption von Kohlensäure. Dieser Kurvenverlauf entspricht der allmählichen Zurückdrängung der Dissoziation der Phosphorsäure durch Kohlensäure, also dem Vorgang, den man als Pufferwirkung der Phosphorsäure bezeichnet, Setzt man dagegen dem Serum gelöstes Hämoglobin zu[2]) (Abb. 1), so ist der Verlauf der Kohlensäurebindungs-

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 89, 156. 1918

[2]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305. 1918.

kurve ein ganz anderer. Nach einem bogenförmigen Anstieg biegt die Kurve in die Richtung ein, die rein physikalischer Absorption der Kohlensäure entspricht. Das Hämoglobin entfaltet keine Pufferwirkung. Wegen dieses von der Phosphorsäurekurve gänzlich abweichenden Verlaufs haben wir die Vorstellung vertreten, daß Hämoglobin, das wegen seiner anodischen Konvektion sicher eine Säure ist, nicht, wie Michaelis will, eine schwache Säure sein kann, sondern daß es eine starke Säure ist, die praktisch vollkommen dissoziiert zu denken ist. Diese Eigenschaft einer Säure verliert dann das Hämoglobin bei Überschreiten der Wasserstoffzahl 7,00 nicht allmählich, wie die Phosphorsäure, sondern plötzlich, sprungweise. Der Vergleich mit der Phosphorsäurebindungskurve ist der dritte Grund, der mit der Anschauung von Michaelis nicht in Einklang zu bringen ist.

Nach der Vorstellung von Michaelis ist das Hämoglobin zunächst eine Säure. Bei $p_H = 7{,}00$ beginnt es seine saure Eigenschaft zu verlieren und während des von uns gefundenen Knicks schließlich basische Eigenschaften anzunehmen. Dabei läßt die Säure erst das von ihr gebundene Alkali los, um dann als Base selbst Kohlensäure zu binden. Wenn der ganze Vorgang durchlaufen ist, müssen also pro Mol Hämoglobin zwei Molen Kohlensäure gebunden werden. Nach Michaelis läuft dieser Vorgang während des Knicks ab. Nun wird aber nach unseren Feststellungen im Knick pro Mol Hämoglobin nur ein Mol Kohlensäure gebunden. Dies ist der vierte Grund, der der Deutung von Michaelis widerspricht.

Bei weiterem Verfolg der Kohlensäurebindungskurve findet sich ein zweiter Knick, der der Wasserstoffzahl 6,39 folgt und in dem wieder pro Mol Hämoglobin ein Mol Kohlensäure gebunden wird. Nach unserer Meinung bekommt das Hämoglobin erst in diesem Knick basische Eigenschaften. Dadurch wird der zweite Knick gut erklärt, während er in der Vorstellungsweise von Michaelis keinen Platz hat. Die beiden Wasserstoffzahlen 7,00 und 6,39, zwischen denen nach unserer Meinung das Hämoglobin nur in ungeladener Form, nicht ionisiert, existenzfähig ist, umrahmen den von Michaelis festgestellten isoelektrischen Punkt des Hämoglobins bei der Wasserstoffzahl 6,74 in ausgezeichneter Weise. Dies ist der fünfte Grund, der gegen die Deutung von Michaelis geltend gemacht werden muß.

Nach der Auffassung von Michaelis entsteht der Knick der Kohlensäurebindungskurve dadurch, daß bei der Wasserstoffzahl 7,00 Hämoglobinbicarbonat gebildet wird. Nach seinen eigenen Feststellungen hat aber das Hämoglobin bei dieser Wasserstoffzahl noch vorwiegend saure Eigenschaften. Statt also als Base zu funktionieren, die Kohlensäure bindet, muß es vielmehr als Säure gelten, die in ihrer Dissoziation zurückgedrängt wird und der Kohlensäure das von ihr gebundene Alkali zur Verfügung stellt. Die alkalischen Valenzen sind aber vor allem Natriumionen und andere Ionen starker Basen. Es entsteht also nicht das Salz einer schwachen Base, des Hämoglobins, mit Kohlensäure, sondern es entsteht in dem Knick Natriumbicarbonat. Für dieses ist aber der Dissoziationsgrad richtig bestimmt. Das hat auch schon Hasselbalch[1]) nachgewiesen. Eine Änderung im Dissoziationsgrad des Bicarbonats, den Michaelis während des Knicks vermutet, tritt gar nicht auf. Eine Bindung von Hämoglobin in basischer Eigenschaft mit Kohlensäure kommt noch nicht in Betracht, sie findet sich erst im zweiten Knick bei $p_H = 6{,}39$. Die Vermutung von Michaelis, daß die von uns gezogenen Linien gar nicht Linien gleicher Wasserstoffzahl seien, ist unzutreffend, weil die Voraussetzung, das Auftreten des hypothetischen undissoziierten Hämoglobinbicarbonats oder eines anderen undissoziierten Bicarbonats, nicht haltbar ist. Dies ist der sechste Grund, der die Deutung von Michaelis unannehmbar macht.

Aus den hier nochmals ausführlich erörterten Gründen haben wir uns bei unserer früheren Veröffentlichung entschlossen, die an sich wahrscheinlichste Auffassung von Michaelis, daß das Hämoglobin sich wie ein Ampholyt verhalte, zu verlassen und zu behaupten, daß die Entladung und die positive Aufladung des Hämoglobins unstetig, bei einer ganz scharf bestimmten Wasserstoffzahl erfolge.

Aus den angeführten Gründen vermögen wir von unserer Vorstellung nicht abzugehen und halten sie gegenüber der Kritik von Michaelis in vollem Umfange aufrecht. Wir bestehen darauf, daß die Abb. 2 unserer früheren Mitteilung[2]) die beobachteten Tatsachen richtig deutet und daß die von uns an diese

[1]) K. A. Hasselbalch, diese Zeitschr. 78, 112. 1916.

[2]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305. 1918.

Betrachtung geknüpften Ausführungen zutreffen. Für die Erklärung des der Erscheinung zugrunde liegenden Vorgangs erbitten wir nach wie vor weitere Unterstützung von anderer Seite.

Für die theoretische Auswertung der weiteren Beobachtungen, die wir[1]) an die Lage des Knicks geknüpft haben, ist das klare Verständnis des zugrunde liegenden Vorganges nicht erforderlich. Es ist gleichgültig, ob man diesen Überlegungen die Vorstellung von Michaelis oder die unsrige zugrunde legt. Nur die absolute Größe der von uns angegebenen Wasserstoffzahlen würde sich verschieben. Der Einfluß anderer Ionen als des Wasserstoffions auf den Entladungsvorgang des Hämoglobins kann deshalb unabhängig von der zugrunde gelegten Auffassung untersucht werden.

In weiteren Versuchsreihen[1]) hatten wir festgestellt, daß die roten Blutkörperchen für bestimmte Ionen, insbesondere die Chlorionen, undurchgängig sind, solange die Lösung, in der die Körperchen suspendiert sind, eine bestimmte Wasserstoffzahl nicht überschreitet. Bei Überschreiten dieser Wasserstoffzahl aber werden die Zellen plötzlich für die geprüften Ionen durchgängig, so daß diese Ionen nunmehr mit dem im Zellinnern eingeschlossenen Hämoglobin in Reaktion treten können. Auch diese plötzlich auftretende Durchgängigkeit der Zellen war als ein Entladungsvorgang an den Zellkolloiden aufgefaßt worden, der offenbar vollkommen analog dem Entladungsvorgang des Hämoglobins verläuft.

Das die Entladung bewirkende Ion war das Wasserstoffion. Waren außer diesem nur Natrium-, Chlorid- und Bicarbonationen in der Lösung zugegen, so erfolgte die Entladung stets bei einer charakteristischen Wasserstoffzahl, die für Hämoglobin allein bei 7,00, für die Zellkolloide bei $p_H = 6{,}67$ lag.

Neben dem Wasserstoffion erwiesen sich aber auch andere in Lösung befindliche Ionen als wirksam. Es zeigte sich, daß die Alkalikationen die Wirkung des Wasserstoffions unterstützen, so daß die Entladung von Hämoglobin und Zellkolloid schon bei alkalischerer Reaktion eintritt. Dieses das Wasserstoffion unterstützende Prinzip war mit dem Buchstaben b bezeichnet worden. Es ergab sich, daß dieses Prinzip zunimmt in der Reihe $Li = Na < K < Rb < Cs$, und zwar vom Natrium an in geome-

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 98, 205 u. 228. 1919.

trischer Progression. Diese gesetzmäßige Progression innerhalb der ersten Reihe des periodischen Systems der Elemente schien auf Eigenschaften der untersuchten Ionen hinzuweisen, die mit der physikalisch-chemischen Konstitution der Materie in Beziehung stehen.

Als bemerkenswerte Tatsache hatte sich ferner noch ergeben, daß in der Wirkung auf das Hämoglobin das biologisch besonders wichtige Kalium aus der Reihe fällt, da es keine stärkere Wirkung entfaltet als Natrium. Rubidium aber ist entsprechend seiner Wirkung auf die Zellkolloide auch am Hämoglobin doppelt so weit von Natrium entfernt, als die in der Reihe sich unmittelbar folgenden Elemente. Die Kaliumwirkung auf Hämoglobin bedeutet demnach tatsächlich eine Lücke in der Reihe. Ferner hatte sich auch bei Prüfung des Ammoniumions das Prinzip b in besonders wirksamer Form nachweisen lassen, jedoch nur bei niedrigen Ammoniumkonzentrationen. Bei Steigerung der Ammoniumkonzentration aber ging die Wirkung des Prinzips b wieder zurück, was wir auf ein antagonistisches, dem Wasserstoffion entgegengesetztes Prinzip a bezogen, das in niedriger Konzentration gegenüber dem schon wirksamen Prinzip b zurücktritt, bei hoher Konzentration aber das Übergewicht über b bekommt.

Die Ausdehnung unserer Untersuchungen auf die Erdalkalien, über die in dieser Mitteilung berichtet werden soll, ergab in der zweiten Reihe des periodischen Systems etwas verwickeltere Verhältnisse als in der ersten. Die Versuche wurden unter genauer Einhaltung der früher geübten Technik durchgeführt. Der Einfluß der Konzentration des geprüften Ions auf die Wirkung trat noch stärker als bei den Alkalien zutage. Deshalb mußten etwas größere Versuchsreihen wenigstens für die wichtigsten Ionen angesetzt werden. Die rein beschreibende Verwendung der beiden Prinzipien a und b, sowie das beim Ammonium gefundene Gesetz, daß bei niedriger Ionenkonzentration b, bei höherer a überwiegt, ermöglichten vollkommene Klärung der Verhältnisse auch bei den Erdalkalien.

Es zeigte sich, daß auch die Erdalkalien auf die zwei geprüften Körper Hämoglobin und Zellkolloid in derselben Weise wirken und daß auch den Elementen der zweiten Reihe des periodischen Systems eine prinzipiell gleichartige Wirkung auf kolloi-

dale Ladungen zukommt. In der Art der Wirkung aber unterscheiden sich die Erdalkalien grundsätzlich von den Alkalien. Die ersten Versuche, die wir anstellten, schienen zu ergeben, daß die Wirkung aller Erdalkalien der der Alkalien gerade ent gegengesetzt ist. Während bei den Alkalien nur das Prinzip b nachweisbar war, fand sich bei den Erdalkalien das Prinzip a. Diese Beobachtung schien biologischen Erfahrungen gut zu entsprechen und den Antagonismus des biologisch wichtigen Calciumions gegen das Kaliumion zu erklären. Nun hatten aber schon bisher manche Beobachtungen darauf hingewiesen, daß kein so ganz reiner Antagonismus dieser beiden Ionen vorliegt, sondern daß sie unter bestimmten Voraussetzungen sich auch unterstützen können. Bei Prüfung von Elektrolytkombinationen machten wir die ersten damit übereinstimmenden Beobachtungen. Die dadurch veranlaßte Prüfung sehr niedriger Konzentrationen der Erdalkalikationen brachte uns dann volle Aufklärung.

Wieder erwies es sich, daß unsere früheren orientierenden Versuche über die Wirkung von Erdalkaliionen auf das Hämoglobin zur Klärung der Verhältnisse nicht ausreichten. In einigen Versuchen mit Calcium hatte sich keine Wirkung auf Hämoglobin ergeben. Ein Bariumversuch dagegen schien auf eine gewisse Wirksamkeit des Bariumions hinzuweisen. Diese früheren Feststellungen mußten durch Vermehrung der Versuche und Anwendung verschiedener Ionenkonzentrationen ergänzt werden. Magnesium und Strontium waren bisher überhaupt nicht untersucht worden. Zu den Hämolyseversuchen wurde das Blut bei allen Versuchen mit Erdalkalien defibriniert, die Erdalkalien wurden als Chloride zugesetzt und mit Saponin hämolysiert. Bei den Versuchen an den Zellkolloiden wurde ein Teil des Chlornatriums der Waschflüssigkeit durch Erdalkalichloride in der Weise ersetzt, daß Isotonie gewahrt blieb. Wir teilen zunächst die Versuchsergebnisse mit, die wie früher im Anhang in Tabellenform zusammengestellt sind.

I. Magnesium.

a) Wirkung auf das Hämoglobin.

In 4 Versuchen wurden defibriniertem Blute wechselnde Mengen von Magnesiumchlorid zugesetzt und hämolysiert. Bei der niedrigsten Konzentration (Abb. 1, Ringe, Tabelle 1) von 0,0002 Mol. ergab sich keine Verschiebung der Lage des Hämoglobinknicks. Die drei bestimmten Werte

liegen bei $p_H = 7,00 \pm 0,01$. Mit 0,001 Mol Magnesiumchlorid (Abb. 1, Punkte, Tabelle 2) dagegen wird der Knick deutlich verschoben. Erst bei deutlich sauerer Reaktion, $p_H = 6,90$, tritt der Knick auf. Mit weiterer Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 0,005 Mol (Abb. 1, liegende Kreuze, Tabelle 3) verschiebt sich der Knick noch weiter nach der sauren Seite, auf $p_H = 6,81$. Damit ist aber offenbar die maximale Wirkung

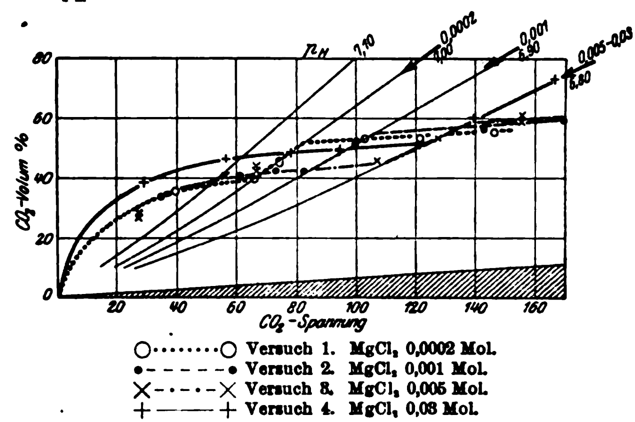


Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Hämolyseblut mit Zusatz von Magnesiumchlorid. Abszisse: Partiardruck der Kohlensäure in mm Hg. Ordinate: Kohlensäurekapazität in Volumprozenten. Schraffiertes Dreieck am Unterrande: physikalisch absorbierte Kohlensäure. Die von der linken unteren Ecke ausgehenden Kurven verbinden Punkte gleicher Wasserstoffzahl. ○, ●, ×, + tatsächliche Bestimmungen.

erreicht, denn bei weiterer, sehr erheblicher Erhöhung der Konzentration auf 0,03 Mol (Abb. 1, stehende Kreuze, Tabelle 4) ändert sich die Lage des Knicks nicht mehr. Magnesium entfaltet also eine deutliche Wirkung auf die Ladung des Hämoglobins, die der des Wasserstoffions antagonistisch ist. Wir haben diese Wirkung als Prinzip a bezeichnet. Auch darin stimmt die Magnesiumwirkung mit früheren Beobachtungen überein, daß bei sehr niedrigen Konzentrationen die Wirkung unmerklich ist, daß sie mit Steigerung der Konzentration allmählich wächst bis zu einem Maximum, auf dem sie verharrt.

b) Wirkung auf die Zellkolloide.

Suspendiert man rote Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung, in der ein sehr kleiner Teil des Natriumchlorids durch Magnesiumchlorid ersetzt ist, so erhält man ein zunächst überraschendes Resultat. Enthält die Suspensionsflüssigkeit 0,003 Mol $MgCl_2$, so ergibt sich nicht eine dem Prinzip a entsprechende hemmende Wirkung auf das Auftreten des Knicks der Kohlensäurebindungskurve, sondern im Gegenteil, der Knick tritt schon bei basischerer Reaktion auf, als ohne Magnesiumzusatz. Mit andern Worten, auf die Zellkolloide wirkt diese Magnesiumkonzentration nach dem das Wasserstoffion unterstützenden Prinzip b (Abb. 2, Punkte, punktierte Kurve, Tabellen 5 und 6). Der Knick der Kurve liegt bei der Wasserstoffzahl 6,80 bzw. 6,79. In diesen Versuchen wurde also eine

Magnesiumkonzentration angewendet, bei der auf das Hämoglobin deutlich das Prinzip a gewirkt hatte. Auf die Zelle aber wirkt diese Konzentration nach dem Prinzip b. Steigerung der Magnesiumchloridkonzentration auf 0,015 Mol (Abb. 2, Ringe, gestrichelte Kurve, Tabelle 7), also bei einer Konzentration, die auf das Hämoglobin längst die maximale Wirkung des Prinzips a ergibt, ist an den Zellkolloiden die Wirkung von b noch stärker ausgesprochen. Der Knick liegt bei $p_H = 6,83$. Erhöht man die Konzentration weiter, so ergeben sich Verhältnisse, die sich ähnlich auch beim Ammonium gefunden hatten. Mit der Verschiebung des Knicks auf die Wasserstoffzahl 6,83 hat die Wirksamkeit des Prinzips b ihr Maximum erreicht. Erhöhung der Konzentration läßt nun aber den Knick nicht auf dieser Wasserstoffzahl beharren, sondern verschiebt ihn nunmehr

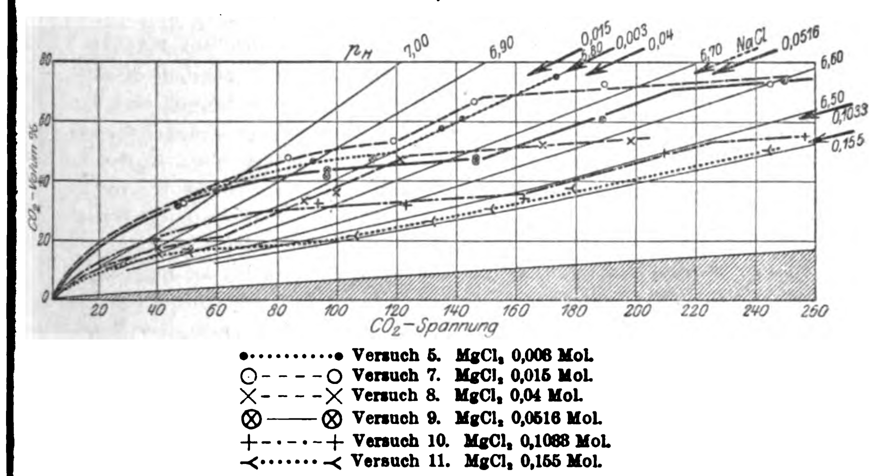


Abb. 2. Erklärung wie Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in isotonischen Lösungen mit $MgCl_2$-Gehalt.

wieder in entgegengesetzter Richtung. Das Maximum der Wirkung von b ist demnach nicht mit Sicherheit genau bei $p_H = 6,83$ zu suchen, sondern kann möglicherweise von diesem Werte etwas verschieden sein, da die gewählten Konzentrationsänderungen des Magnesiumchlorids ziemlich große Sprünge machen. Weit kann aber das Maximum der b-Wirkung keinesfalls von $p_H = 6,83$ entfernt sein.

Mit der Konzentration von 0,04 Mol $MgCl_2$, also einem Werte, der von dem vorangehenden nicht sehr weit entfernt ist (Abb. 2, liegende Kreuze, gestrichelte Kurve, Tabelle 8) wird der Knick etwas seinem ursprünglichen Werte angenähert, er liegt bei $p_H = 6,76$. Das Prinzip b überwiegt noch deutlich, aber schon macht sich das Prinzip a in geringem Maße geltend. Daß bei dieser Konzentration die a-Wirkung noch sehr gering ist, macht es nach früheren Erfahrungen wahrscheinlich, daß im vorangehenden Versuche (Nr. 7) mit der wenig geringeren Magnesiumkonzentration die b-Wirkung ihr Maximum besessen hatte. Denn wenn einmal die Wirkung von a sich geltend macht, so wird sie nach früheren

und später noch mitzuteilenden Erfahrungen bald sehr hochgradig. Auch im vorliegenden Falle bewirkt schon geringfügige weitere Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 0,0516 Mol sofort ein weiteres starkes Hervortreten des Prinzips a (Abb. 2, Kreuzringe, ausgezogene Kurve, Tabelle 9). Der Knick ist jetzt zu seiner Ausgangslage zurückgekehrt. er liegt bei $p_H = 6{,}66$. In reiner isotonischer Lösung von Magnesiumchlorid, 0,1033 Mol (Abb. 2, stehende Kreuze, strichpunktierte Kurve, Tabelle 10) wird der Knick noch weiter nach $p_H = 6{,}46$ verschoben. Weitere Erhöhung der Magnesiumkonzentration ist nicht möglich, wenn isotonische Lösungen verwendet werden sollen. Da sich jedoch bei der Analyse der Kochsalzlösungen ergeben hatte, daß deutliche Hypertonie der Suspensionsflüssigkeit ohne Einfluß auf die Lage des Knicks ist, wurde in zwei weiteren Versuchen (Abb. 2, Dreistern, punktierte Kurve, Tabellen 11 und 12) die Magnesiumkonzentration nochmals beträchtlich erhöht, auf 0,155 Mol. Wenn, was wahrscheinlich ist, die Verhältnisse beim Magnesium dieselben sind wie beim Kochsalz, so würde diese Hypertonie der Lösung ohne Einfluß auf das Ergebnis und eine etwaige Wirkung allein auf Rechnung der Konzentrationserhöhung des Magnesiums zu setzen sein. In der Tat findet sich eine weitere Verschiebung der Lage des Knicks bis auf die Wasserstoffzahl $p_H = 6{,}41$, als Durchschnitt von acht bestimmten Werten. Die Einzelwerte dieser Bestimmungen weichen etwas stärker als üblich von diesem Mittelwerte ab, weil die Fehlerbreite der Methode bei der ungünstigen, sehr tiefen Lage des Knicks eine etwas größere ist. Da trotz erheblicher Erhöhung der Magnesiumkonzentration die Verschiebung des Knicks gegenüber dem vorangehenden Werte nur noch eine geringe ist, darf angenommen werden, daß damit der Endwert der Verschiebung des Prinzips a erreicht ist.

Bei niedriger Konzentration von Magnesium macht sich also auf die Zellkolloide das Prinzip b bemerkbar, erst bei hoher Konzentration überwiegt mehr und mehr das Prinzip a. Das entspricht dem Verhalten dieser beiden Prinzipien im Ammonium. Die Konzentration, bei der das Prinzip a des Magnesium die maximale Wirkung auf die Zellkolloide entfaltet, ist sehr groß, viel größer als beim Hämoglobin. Das Prinzip b hatte sich am Hämoglobin nicht gefunden. Doch ist es bei den erheblichen Sprüngen der geprüften Konzentrationen wahrscheinlich, daß wir die Konzentration übersprungen haben, bei der auch auf das Hämoglobin die Wirkung des Prinzips b hervortritt. Bei der viel größeren Empfindlichkeit des Hämoglobins für Konzentrationsänderungen ist ein solches Überspringen der wirksamen Konzentration sehr wohl denkbar.

II. Calcium.

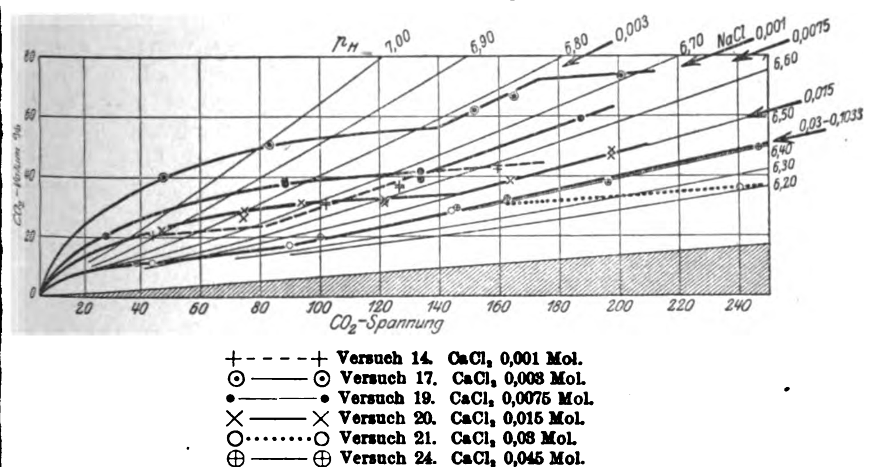
a) Wirkung auf das Hämoglobin.

Schon früher hatten wir den Einfluß des Calciumchlorids auf den Entladungsvorgang des Hämoglobins geprüft und festgestellt, daß es in Konzentrationen von 0,02 bzw. 0,03 Mol keinen Einfluß ausübt. Um über diesen Punkt sicher zu gehen, haben wir in einem weiteren Versuch die Calcium-

konzentration nochmals verdoppelt auf 0,06 Mol (Tabelle 13). Die drei bestimmten Werte liegen bei $p_H = 7,00$ bzw. 6,97 bzw. 6,95. Der letzte Wert liegt etwas weiter von 7,00 entfernt, als der üblichen Fehlerbreite entspricht. Es ist also nicht ganz ausgeschlossen, daß Calcium in dieser hohen Konzentration einen ganz geringen Einfluß im Sinne des Prinzips a ausübt. Da aber die andern beiden Werte mit dem unveränderten Knick in Einklang zu bringen sind, ist dieser Schluß doch recht unsicher. Es bleibt also dabei, daß Calcium auf die Lage des Hämoglobinknicks keinen sicheren Einfluß ausübt.

b) Wirkung auf die Zellkolloide.

Suspendiert man nun rote Blutkörperchen in isotonischen Kochsalzlösungen mit geringem Zusatz von Chlorcalcium, so ergeben sich recht verwickelte Verhältnisse. Die niedrigste Konzentration von 0,001 Mol $CaCl_2$ (Abb. 3, stehende Kreuze, gestrichelte Kurve, Tabelle 14) verändert die Lage des Knicks gegenüber der reinen Kochsalzlösung nicht erkennbar. Die vier im Knick liegenden Punkte dieses Versuchs liegen bei $p_H = 6,66$ bzw. 6,65 bzw. 6,62 bzw. 6,63. Dieselben Ergebnisse haben zwei weitere



+- - - - -+ Versuch 14. $CaCl_2$ 0,001 Mol.
⊙ ——— ⊙ Versuch 17. $CaCl_2$ 0,003 Mol.
• ——— • Versuch 19. $CaCl_2$ 0,0075 Mol.
× ——— × Versuch 20. $CaCl_2$ 0,015 Mol.
○ ········ ○ Versuch 21. $CaCl_2$ 0,03 Mol.
⊕ ——— ⊕ Versuch 24. $CaCl_2$ 0,045 Mol.

Abb. 3. Erklärung wie Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in isotonischen Lösungen mit $CaCl_2$-Gehalt.

Versuche (Tabellen 15 und 16) mit den Werten 6,65; 6,63; 6,66; 6,65; 6,65 im ersten und 6,65; 6,66; 6,62; 6,63; 6,64 im zweiten Versuche. Erhöht man dagegen die Konzentration auf das Dreifache, auf 0,003 Mol (Abb. 3, Punktringe, ausgezogene Kurve, Tabellen 17 und 18), so tritt die Wirkung des Prinzips b deutlich in Erscheinung. Der Knick tritt viel früher auf als ohne Calciumzusatz. Die Werte für den Knick liegen bei $p_H = 6,78$; 6,78; 6,77 im einen und bei 6,76 und 6,79 im zweiten Versuche. Dieselben Überlegungen, die beim Magnesium angestellt wurden, führen zu der Überzeugung, daß damit nicht genau die maximale b-Wirkung bestimmt ist, zumal die nächste geprüfte Konzentration ziemlich weit von 0,003 entfernt ist.

Man muß also mit der Möglichkeit rechnen, daß bei optimaler Konzentration noch etwas größere Beträge erreicht würden. Erhöhung der Konzentration auf 0,0075 Mol. (Abb. 3, Punkte, ausgezogene Kurve, Tabelle 19) läßt nun schon die beginnende Wirkung des Prinzips a erkennen. Der Knick kehrt ziemlich genau in die ursprüngliche Lage zurück. Die bestimmten Werte ergeben für den Knick die p_H = 6,66; 6,63; 6,64; 6,64. Verdoppelung dieser Konzentration, $CaCl_2$ 0,015 Mol (Abb. 3, liegende Kreuze, ausgezogene Kurve, Tabelle 20) bringt das Prinzip a schon mächtig zur Geltung. Der Knick liegt bei p_H = 6,50 bzw. 6,52 bzw. 6,50. Abermalige Verdoppelung auf 0,03 Mol (Abb. 3, Ringe, punktierte Kurve, Tabellen 21, 22, 23) verstärkt die Wirkung von Prinzip a. Der Knick liegt bei den Werten 6,42; 6,42; 6,44. Weitere Erhöhung auf 0,045 Mol (Abb. 3, Kreuzringe, ausgezogene Kurve, Tabellen 24 und 25) ändert an diesem Ergebnis nichts mehr, die Werte liegen bei p_H = 6,43; 6,42; 6,42; 6,38; 6,39 bzw. bei 6,45; 6,36. Und auch die Verwendung reiner isotonischer Chlorcalciumlösung (Tabelle 26) ergibt den Knick an derselben Stelle, bestimmter Wert bei p_H = 6,45. Auf die Zellkolloide erweist sich also das Calciumion höchst wirksam. Bei kleinsten Dosen wird jede Wirkung vermißt, bei kleinen Dosen macht sich das Prinzip b geltend, das mit Steigerung der Dosis durch das nunmehr wirksame Prinzip a mehr und mehr zurückgedrängt wird, bis schließlich das Prinzip a einen Endwert erreicht, auf dem es auch bei weiterer sehr erheblicher Steigerung der Dosengröße verharrt. Infolge der starken Verschiebung des Knicks liegen die bestimmten Werte alle bei niedrigen Volumprozenten der Kohlensäurekapazität. Dieser für die Analyse ungünstige Umstand bringt es mit sich, daß die Fehlerbreite der Methode etwas größer ist, weshalb die tatsächlich bestimmten Werte weniger gut übereinstimmen als in früheren Fällen. Die Übereinstimmung ist aber unter Berücksichtigung dieses Umstandes noch immer eine vollkommen ausreichende. Um den Knick innerhalb des Bezirkes der Kohlensäurespannung, der mit unseren Analysenapparaten zugänglich ist, erreichen zu können, mußten wir die Lage der von uns analysierten Kurven künstlich dadurch tiefer legen, daß wir der Waschflüssigkeit einen kleinen Überschuß von Chlorionen in Form von Salzsäure zusetzten. Die Konzentration der überschüssigen Chlorionen ist in den Tabellen angegeben. Es hat uns manche Schwierigkeiten gemacht, die erforderliche Salzsäurekonzentration zu finden. Mancher Versuch ging verloren, weil wir entweder zu viel Salzsäure zugesetzt hatten oder bei zu geringem Säurezusatz den Knick nicht erreichen konnten.

III. Strontium.

a) Wirkung auf das Hämoglobin.

Strontium hatten wir bisher noch nicht untersucht gehabt. Bei der niedrigen Konzentration von 0,005 Mol Strontiumchlorid fand sich der Knick ein klein wenig im Sinne des Prinzips b verschoben. Die Werte liegen bei p_H = 7,03 und 7,03 (Abb. 4, liegende Kreuze, ausgezogene Kurve, Tabelle 27). Verdoppelung der Konzentration auf 0,01 Mol (Abb. 4, Punkte, strichpunktierte Kurve, Tabelle 28) läßt alsbald das Prinzip a in hohem

Grade wirksam werden, die Werte des Knicks liegen bei $p_H = 6{,}78$; 6,78; 6,80. Erhöhung der Konzentration auf 0,04 Mol (Abb. 4, stehende Kreuze,

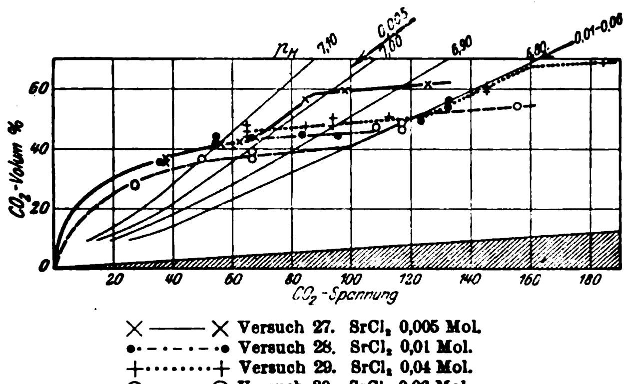


Abb. 4. Erklärung wie Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Hämolyseblut mit Zusatz von Strontiumchlorid.

punktierte Kurve, Tabelle 29) und auf 0,06 Mol (Abb. 4, Ringe, gestrichelte Kurve, Tabelle 30) ändert an diesem Ergebnisse nichts mehr. Die Werte sind im ersten Falle $p_H = 6{,}79$ und 6,78, im zweiten 6,83; 6,80 und 6,78.

b) Wirkung auf die Zellkolloide.

Schon die sehr niedrige Konzentration von 0,001 Mol Strontiumchlorid (Abb. 5, Punkte, ausgezogene Kurve, Tabelle 31) übt eine sehr starke Wirkung im Sinne des Prinzips b aus. Im Knick wurden die Werte $p_H = 6{,}79$;

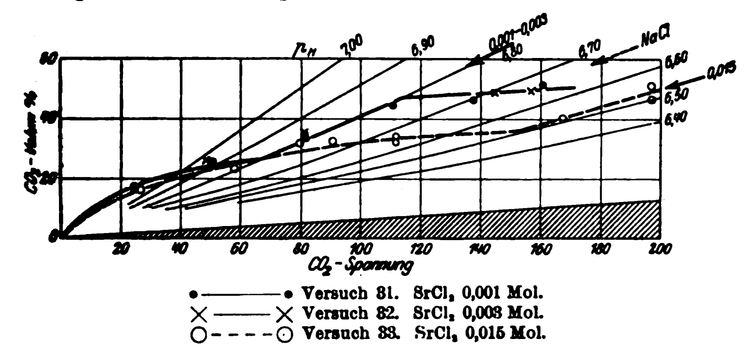


Abb. 5. Erklärung wie Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in isotonischen Lösungen mit $SrCl_2$-Gehalt.

6,81 und 6,78 bestimmt. Steigerung der Konzentration auf 0,003 Mol (Abb. 5, liegende Kreuze, ausgezogene Kurve, Tabelle 32) ändert bemerkenswerterweise an diesem Ergebnis nichts, der Knick liegt bei $p_H = 6{,}81$; 6,83. Dieser Wert kann also als die maximale und endgültige Verschiebung im Sinne des Prinzips b angesehen werden. Weitere beträchtliche Steigerung der Konzentration auf 0,015 Mol läßt das Prinzip a hervortreten (Abb. 5,

Ringe, gestrichelte Kurve, Tabelle 33). Der Knick ist stark nach rechts vom Kochsalzknick verschoben, die Werte liegen bei $p_H = 6{,}51$; 6,52; 6,55; 6,50. Der endgültige Wert ist damit offenbar noch nicht erreicht. Er konnte für Strontium nicht ermittelt werden, weil bei weiterer Steigerung der Strontiumkonzentration Hämolyse eintrat.

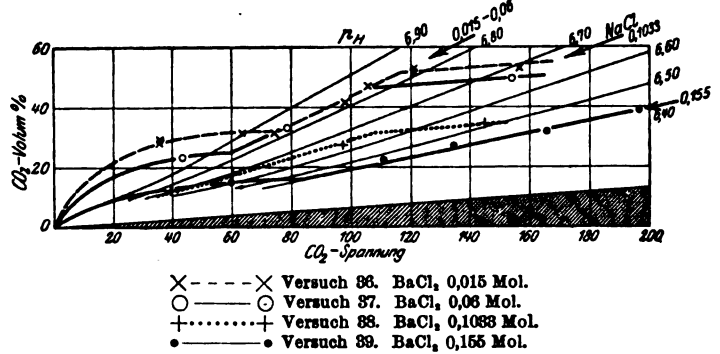
IV. Barium.

a) Wirkung auf das Hämoglobin.

In einem früheren Versuche[1]) hatten wir festgestellt, daß bei Barium mit der Möglichkeit einer geringen Verschiebung des Hämoglobinknicks gerechnet werden muß. Damals hatten wir noch keine Kenntnis von dem großen Einfluß der Konzentration. Wir haben deshalb unseren früheren Versuch durch weitere Versuche mit anderen Konzentrationen ergänzt. Mit der ziemlich hohen Bariumkonzentration von 0,01 Mol (Tabelle 34) wird die Lage des Hämoglobinknicks nicht beeinflußt, die Werte der tatsächlich bestimmten Punkte liegen bei $p_H = 6{,}995$; 6,995; 7,01; 7,02. Hier fügt sich unser früherer Versuch ein (Nr. XXVIII der früheren Mitteilung), der bei einer Konzentration von 0,03 Mol eine Verschiebung des Knicks nach $p_H = 7{,}04$, also im Sinne des Prinzips b ergibt. Weitere Erhöhung auf 0,06 Mol (Tabelle 35) läßt dann das Prinzip a rein hervortreten. Die im Knick liegenden Punkte haben die Wasserstoffzahl 6,80; 6,78; 6,76 +. Wir glauben damit den Endwert des Prinzips a erreicht zu haben.

b) Wirkung auf die Zellkolloide.

Eine schon ziemlich hohe Konzentration, 0,015 Mol (Abb. 6, liegende Kreuze, gestrichelte Kurve, Tabelle 36), läßt das Prinzip b rein hervortreten, der Knick liegt bei $p_H = 6{,}83$; 6,82; 6,83. Weitere beträchtliche



×– – – –× Versuch 36. $BaCl_2$ 0,015 Mol.
○——— ⊙ Versuch 37. $BaCl_2$ 0,06 Mol.
+·········+ Versuch 38. $BaCl_2$ 0,1033 Mol.
•———— • Versuch 39. $BaCl_2$ 0,155 Mol.

Abb. 6. Erklärung wie Abb. 1. Kohlensäurebindungskurven von Blutkörperchensuspensionen in isotonischen Lösungen mit $BaCl_2$-Gehalt.

Erhöhung auf 0,06 Mol (Abb. 6, Ringe, ausgezogene Kurve, Tabelle 37) ändert an diesem Ergebnis nichts, der Knick liegt bei 6,83. Damit ist also das Maximum der Wirkung des Prinzips b erreicht, das während einer sehr

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 90, 305. 1918.

bedeutenden Breite der Konzentration erhalten bleibt. Erst mit sehr großer Konzentrationssteigerung bis zur reinen isotonischen Bariumchloridlösung (Abb. 6, stehende Kreuze, punktierte Kurve, Tabelle 38) macht sich der Beginn des Prinzips a geltend. Die Lage des Knicks entspricht jetzt wieder der einer reinen Kochsalzlösung mit dem Knick bei p_H = 6,67; 6,63. Auf Grund derselben Überlegungen wie beim Magnesium haben wir uns für berechtigt gehalten, eine weitere beträchtliche Konzentrationssteigerung vorzunehmen, obgleich die Lösung dadurch stark hypertonisch wird. Mit 0,155 Mol Bariumchlorid (Abb. 6, Punkte, ausgezogene Kurve, Tabelle 39 und 40) wird der Knick noch weiter im Sinne des Prinzips a verschoben. Wir nehmen an, daß er damit seinen Endwert erreicht hat. Der Knick liegt bei p_H = 6,44; 6,42; 6,39; 6,39 und im zweiten Versuch bei 6,40; 6,39.

Rückblick.

Wie für die Alkalien, so ergeben sich auch für die Erdalkalien aus unsern Versuchen ganz bestimmte Gesetzmäßigkeiten, denen die Wirkung auf Hämoglobin und Zellmembran folgt. Auf beide Substanzen ist die Wirkung prinzipiell dieselbe. Die Wirkungsart aller vier geprüften Erdalkalien zeigt sich in hohem Maße, aber durchaus eindeutig abhängig von der verwendeten Konzentration. In allen Versuchsreihen zeigte es sich, daß die ganz niedrigen Konzentrationen noch wirkungslos sind. Überschreitet man die Schwelle der eben wirksamen Dosen, so kommt zunächst die Wirkung im Sinne des Prinzips b zur Geltung, d. h. die Entladung des Hämoglobins tritt schon bei weniger saurer Reaktion ein als ohne Zusatz von Erdalkalien. Mit Steigerung der Dosis macht sich das Prinzip a geltend, bei mittleren Dosen in dem Sinne, daß ein Gleichgewicht beider Prinzipien auftritt, indem die Entladung des Hämoglobins mit steigender Konzentration allmählich immer mehr verzögert wird. Die Lage des Knicks schiebt sich dabei wieder über die Ausgangslage weg, immer weiter nach rechts, bis schließlich ein Endwert erreicht wird, der durch weitere Steigerung der Dosis nicht überschritten werden kann. Eine Ausnahme macht die Wirkung des Calciums auf das Hämoglobin. Das Calcium fällt bezüglich dieser Wirkung aus der Reihe, eine sichere Änderung der Ladung des Hämoglobins durch Calcium ist nicht nachweisbar. Auf die Zellkolloide dagegen wirkt Calcium in derselben Weise ein wie die übrigen Erdalkalien. Diese außerordentlich bemerkenswerte Tatsache hat eine volle Analogie in der Wirkungsweise des neben dem Natrium biologisch wichtigsten Vertreters der Alkalireihe, des

Kalium, das in seiner Wirkung auf das Hämoglobin ebenfalls aus der Reihe gefallen war und sich unwirksam erwiesen hatte. Wie beim Kalium können wir auch beim Calcium diese Tatsache nur verzeichnen, ohne sie zu erklären.

Die Wirkung des Prinzips b ist bei allen Erdalkalien verhältnismäßig nur schwach ausgesprochen. Die Verschiebung im Sinne dieses Prinzips ist eine sehr geringe, beim Hämoglobin nur eben nachweisbare. Mit Magnesium ist es uns überhaupt nicht gelungen, die Dosis zu finden, die am Hämoglobin im Sinne b wirkt. Viel stärker ausgesprochen ist bei hohen Dosen die Wirkung des Prinzips a, die stets eine sehr erhebliche Verschiebung des Knicks im Sinne einer Hemmung des Entladungsvorgangs herbeiführt.

Noch auffallender werden unsere Ergebnisse, wenn man die erreichten Endwerte betrachtet. In der Wirkung auf das Hämoglobin haben wir beim Magnesium den Endwert der b-Wirkung nicht beobachtet, das Calcium fällt aus. Für Strontium und Barium liegt der äußerste Knick unter b-Wirkung bei $p_H = 7{,}03$ für Strontium, 7,04 für Barium. Die Verschiebung ist sehr gering, für beide Substanzen eben wahrnehmbar und für beide gleich groß. Die maximale Wirkung des Prinzips a verschiebt den Knick für Magnesium auf $p_H = 6{,}81$, Calcium fällt aus, für Strontium ergab sich 6,79 +, für Barium 6,78 +. D. h. der erreichte Endwert der a-Wirkung ist für Magnesium, Strontium und Barium derselbe, rund 6,80. An den Zellkolloiden finden sich dieselben Verhältnisse noch unverkennbarer. Für die b-Wirkung ist der erreichte Maximalwert beim Magnesium $p_H = 6{,}83$, beim Calcium 6,78, beim Strontium 6,82 und beim Barium 6,83. Aus den früher geschilderten Gründen ist es wahrscheinlich, daß wir für Calcium nicht ganz die optimale Konzentration für die b-Wirkung geprüft haben. Wir müssen also unsere Versuche so verstehen, daß die maximale b-Wirkung bei optimaler Konzentration für alle Erdalkalien den Knick auf $p_H =$ ca. 6,83 verschiebt. Die maximale a-Wirkung konnte beim Strontium wegen eintretender Hämolyse nicht ermittelt werden, für Magnesium liegt sie bei $p_H = 6{,}41$, für Calcium bei 6,42 —, für Barium bei 6,41, d. h. für die 3 Substanzen bei demselben Wert. Was wir schon bei den Alkalien ausgesprochen hatten, müssen wir bei den Erdalkalien wiederholen. Wir halten es für ausgeschlossen, daß diese absolut

übereinstimmenden Werte für die Endwirkung auf einer Zufälligkeit beruhen. Wir sehen vielmehr in unseren Ergebnissen den Ausdruck einer tieferen Gesetzmäßigkeit, die in der Konstitution der Materie begründet ist und auf die wir nach Anstellung weiterer Untersuchungen zurückkommen werden.

Die gefundene Gesetzmäßigkeit läßt sich folgendermaßen aussprechen:

Die Erdalkalien Magnesium, Calcium, Strontium und Barium enthalten sowohl das Prinzip b als das Prinzip a, ersteres in einer sehr wenig wirkungsvollen Form, letzteres in stark wirksamer Form. Der maximale Wirkungsgrad sowohl des Prinzips b als des Prinzips a ist bei optimaler Konzentration für alle Erdalkalien genau derselbe.

Es bleibt noch zu prüfen, welche Konzentration der verschiedenen Erdalkalichloride diese maximale Wirkung der beiden Prinzipien entfaltet. Für alle Erdalkalien mit Ausnahme des Calciums erweist sich das Hämoglobin als die empfindlichere Substanz, bei der die Wirkung b mit niedrigerer Konzentration erreicht wird als an den intakten Zellen, bei der dann früher schon das Prinzip a sich geltend macht und bei der schließlich die maximale a-Wirkung bei niedrigeren Konzentrationen erreicht wird, ja sogar bei Konzentrationen, die auf die ganze Zelle noch die volle b-Wirkung ergeben, besonders bei Magnesium und Barium.

Um die volle Wirkung auf das Hämoglobin zu erhalten, ist von Magnesium die niedrigste Konzentration erforderlich, Calcium fällt aus, von Strontium braucht man niedrigere Konzentrationen als von Barium. Je höher also das Molekulargewicht, desto höhere Konzentrationen sind zur Wirkung erforderlich. Das Maximum der b-Wirkung liegt für Magnesium vermutlich zwischen der Konzentration von 0,0002 und 0,001 Mol, für Strontium bei 0,005 Mol, für Barium bei 0,03 Mol. Das Maximum der a-Wirkung ist mit Magnesium bei 0,005 Mol erreicht, mit Strontium bei 0,01 Mol, mit Barium bei 0,06 Mol.

Nicht ganz so regelmäßig gestaltet sich der Einfluß des Molekulargewichts auf die Wirkung an den gewaschenen Zellen. Hier sind die beiden mittleren Elemente, Calcium und Strontium, die wirksamsten. Das Maximum der b-Wirkung erreicht Magne-

sium bei einer Konzentration von 0,003 Mol noch nicht ganz, ebensowenig vermutlich das Calcium, während mit Strontium bei dieser Konzentration schon die volle b-Wirkung erhalten wird. Magnesium gibt das Maximum der b-Wirkung noch bei der Konzentration von 0,015 Mol, während bei Calcium schon mit der halb so großen Menge von 0,007 5 eine deutliche a-Wirkung eintritt und bei Strontium mit der Dosierung von 0,015 Mol die a-Wirkung ihr Maximum schon erreicht hat. Barium ist wie auf das Hämoglobin, so auch auf die Zellen erst in viel höheren Konzentrationen wirksam. Das Maximum der b-Wirkung findet sich bei Konzentrationen zwischen 0,015 und 0,06 Mol. Die maximale a-Wirkung andererseits wird sowohl bei Magnesium wie bei Barium erst mit den hypertonischen Lösungen von 0,155 Mol erreicht, während dieselbe Wirkung schon mit 0,03 Mol Calcium erhalten wird. Bei Strontium kann der Endwert wegen auftretender Hämolyse nicht bestimmt werden, er wird aber nicht wesentlich von dem für Calcium bestimmten entfernt liegen, weil mit der nächstniedrigeren geprüften Konzentration von 0,015 Mol bei beiden Elementen schon deutliche und gleich starke a-Wirkung erhalten wurde.

Um die maximale Wirkung zu erreichen, ist also sowohl am Hämoglobin als an der Zelle bei Barium die höchste Konzentration erforderlich. Das Magnesium andererseits erweist sich in seinem Einfluß auf das Hämoglobin bei sehr niedriger Konzentration wirksam, während an der ganzen Zelle schon zur Erreichung der b-Wirkung, vor allem aber zur Erreichung der a-Wirkung viel höhere Konzentrationen notwendig sind als von Calcium und Strontium. Die Regel, je höher das Molekulargewicht, desto höher die zur Wirkung erforderliche Konzentration, gilt also zwar am Hämoglobin, nicht aber an der ganzen Zelle. Verschieden hochgradige Dissoziation der Chloride kann ebensowenig für den Unterschied der Wirkungsstärke verantwortlich gemacht werden. Denn alle Erdalkalisalze sind stark dissoziiert und wenn überhaupt ein Unterschied besteht, so jedenfalls nur ein geringer und in dem Sinne, daß Barium am stärksten, Magnesium am schwächsten basische Eigenschaften entfaltet. Man kann die Beobachtung also nicht damit erklären, daß das eine oder andere Salz infolge schwächerer Dissoziation weniger wirksame Ionen abspalte. Wenn man die Wirkung der geprüften

Substanzen als Oberflächenwirkung auffaßt, so wird man wohl annehmen können, daß je nach der Beschaffenheit der Oberfläche des Kolloids die eine oder andere Substanz stärker in der Oberfläche adsorbiert werde. Damit wären die beobachteten Unterschiede erklärbar. Tatsachen, die zeigen, ob diese Vermutung zutrifft, liegen bisher nicht vor. Jedenfalls aber, und darin liegt die große biologische Bedeutung unserer Beobachtungen, können wir jetzt verstehen, weshalb ein und derselbe Elektrolyt auf verschiedene biologische Substrate — Zellen, Fermente usw. — je nach seiner spezifischen Affinität, d. h. wohl Adsorption, bei derselben Konzentration bald im Sinne des Prinzips b, bald im Sinne a wirkt, weshalb der Grad dieser Wirkung ein ungleicher und manchmal ein scheinbar absolut spezifischer ist. Das Verständnis für den Nutzen von Elektrolytkombinationen scheint uns dadurch um ein gutes Stück gefördert zu sein.

V. Einige Beobachtungen über Elektrolytkombinationen.

Die eben geschilderten Überlegungen haben uns veranlaßt, einige wenige orientierende Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Elektrolytkombinationen anzustellen. Wir wählten die biologisch besonders wichtige Ringersche Lösung. Während wir bisher außer Chlornatrium immer nur noch ein Chlorid in die Lösung eingeführt hatten, suspendierten wir die Blutkörperchen jetzt in isotonischen Lösungen, die sowohl Kalium- als Calciumchlorid enthielten.

Zunächst suspendierten wir Blutkörperchen in einer Ringerlösung von der Zusammensetzung NaCl 0,146 Mol, KCl 0,005 64 Mol, $CaCl_2$ 0,002 16 Mol. Mit derselben Kaliumkonzentration allein sollte nach den früheren Versuchen der Knick von 6,67 auf etwa 6,70, also nur ganz wenig verschoben werden[1]). Die gebrauchte Calciumkonzentration allein sollte eine schwache b-Wirkung entfalten und den Knick ungefähr auf 6,70 bis 6,75 verschieben, da 0,001 Mol $CaCl_2$ noch keine Wirkung entfalten, 0,003 Mol noch nicht maximal, sondern erst bis $p_H = 6{,}78$ verschieben (Tabellen 14—18). Der Versuch (Tabelle 41) ergibt den Knick bei $p_H = 6{,}81$. Demnach unterstützen sich die beiden Ionen in ihrer b-Wirkung gegenseitig, indem der Knick stärker verschoben wird als es bei derselben Konzentration nur eines der beiden Salze zu erwarten wäre.

Weniger eindeutig ist der letzte Versuch (Tabelle 42), in dem die Calciumkonzentration erhöht, die Kaliumkonzentration herabgesetzt wurde.

---

[1]) H. Straub u. Kl. Meier, diese Zeitschr. 98. 1919. 249 (Tabellen 4 und 5).



Die Calciumkonzentration ist jetzt so groß, daß wahrscheinlich gerade die maximale b-Wirkung zu erwarten wäre, nämlich 0,003 36 Mol Die Kaliumkonzentration dagegen, 0,003 2 Mol., ist so niedrig, daß möglicherweise überhaupt noch keine Wirkung auf den Knick eintreten würde. Der Erfolg ist bei Versuch 42 der, daß der Knick auf das Maximum der b-Wirkung des Calciums verschoben wird. Er liegt bei $p_H = 6{,}83$. Ein sicherer Einfluß des zugefügten Kaliums ist also nicht nachweisbar.

Die wenigen Versuche sind nicht ausreichend, das Thema zu erschöpfen. Sie lassen aber doch ahnen, welche biologischen Wirkungsmöglichkeiten sich ergeben, wenn die Konzentrationen so gewählt werden, daß neben dem Prinzip b auch das Prinzip a wirksam werden kann. Man kann sich leicht vorstellen, wie auf diese Weise durch Zufügen von Calcium zu einer kaliumhaltigen Lösung an der einen Wirkungsstelle das Prinzip a überwiegen, an der andern das Prinzip b des Kaliums gesteigert werden kann (analog Versuch 41). Die Einführung von Magnesium, Strontium und Barium an Stelle des Calciums ergibt weitere Kombinationsmöglichkeiten.

Zusammenfassung.

Der Verlauf der Entladung und Umladung des Hämoglobins unter dem Einfluß steigender Säuerung der Lösungsflüssigkeit wird erneut besprochen. Es werden die Gründe angeführt, die der Auffassung von Michaelis über diesen Vorgang widersprechen. Hämoglobin kann nicht als Ampholyt betrachtet werden, die Ladungsänderung geschieht vielmehr sprungweise bei charakteristischer Wasserstoffzahl.

Bei der Prüfung des Einflusses der Erdalkalien Magnesium, Calcium, Strontium und Barium auf die Ladung des Hämoglobins und der Zellkolloide menschlicher Erythrocyten ergab sich, daß alle Erdalkalien in niedriger Konzentration das auch in den Alkalien nachgewiesene, das Wasserstoffion unterstützende Prinzip b enthalten. Die maximale, durch dieses Prinzip b herbeigeführte Ladungsänderung ist jedoch viel geringer als bei den Alkalien. Das Prinzip b tritt demnach in den Erdalkalien nur in wenig wirkungsstarker Form auf. Der maximale Wert des Prinzips b ist bei optimaler Konzentration für alle Erdalkalien derselbe: der Hämoglobinknick wird auf $p_H = 7{,}03$, der Knick an den ganzen Zellen auf 6,83 verschoben.

Ähnlich wie im Ammonium findet sich auch in den Erdalkalien bei höherer Konzentration ein antagonistisches Prinzip a,

das der Entladung der Kolloide entgegenwirkt. Der Endwert der Wirkung dieses Prinzips a ist für alle Erdalkalien derselbe. Der Hämoglobinknick wird auf $p_H = 6{,}79$, der Knick an den ganzen Zellen auf 6,41 verschoben.

In der Wirkung auf das Hämoglobin fällt das biologisch wichtige Calcium ebenso wie das Kalium aus der Reihe. Beide sind auf das Hämoglobin ohne Einfluß, während sie auf die Zellen in der zu erwartenden Weise wirken.

Die Tatsache, daß alle Erdalkalien denselben Endwert des Prinzips b sowohl wie des Prinzips a erreichen, legt die Vermutung nahe, daß der Erscheinung ein in der physikalisch-chemischen Konstitution der Materie begründetes Gesetz zugrunde liegt.

Die beobachteten Erscheinungen geben tieferen Einblick in die verschiedenen Möglichkeiten der Wirkung von Elektrolytkombinationen auf biologisch wichtige Kolloide.

Versuchsprotokolle.

Magnesium.

I. Hämolyseversuche.

1. Abb. 1. Kurve 1. Ringe, punktierte Kurve

Defibriniertes Blut + $MgCl_2$ 0,0002 Mol + Saponin.

CO_2-Spannung	39,8	66,0	74,3	102,9	121,2	146,2
CO_2-Kapazität	35,7	**39,5**	**45,8**	53,1	53,3	55,3
			45,1		53,5	
p_H	7,19	**6,99**	**7,00**	6,90	6,82	6,74
			6,99		6,82	
		Knick.				

2. Abb. 1. Kurve 2. Punkte, gestrichelte Kurve.

Defibriniertes Blut + $MgCl_2$ 0,001 Mol + Saponin.

CO_2-Spannung	34,9	61,5	73,1	82,3	99,6	142,8	169,3
CO_2-Kapazität .	33,9	40,9	42,7	42,2	**51,4**	56,5	59,5
p_H	7,23	7,03	6,97	6,91	**6,90**	6,77	6,70
					Knick.		

3. Abb. 1. Kurve 3. Liegende Kreuze, strichpunktierte Kurve.

Defibriniertes Blut + $MgCl_2$ 0,005 Mol + Saponin.

CO_2-Spannung	27,1	56,2	66,8	107,1	127,5	155,6
CO_2-Kapazität	26,8	40,9	42,1	**45,4**	**53,2**	60,9
	28,1		44,1			58,6
p_H	7,25	7,09	7,01	**6,82**	**6,80**	6,76
	7,27		7,03	Knick.		6,74

4. Abb. 1. Kurve 4. Stehende Kreuze, ausgezogene Kurve.

Defibriniertes Blut + $MgCl_2$ 0,03 Mol + Saponin.

CO_2-Spannung	29,0	56,4	78,0	94,3	139,0	165,3
CO_2-Kapazität	38,6	46,5	48,3	49,0 49,7	**60,4**	**73,1**
p_H	7,36	7,13	7,00	6,91 6,92	**6,81**	**6,81**
					Knick.	

II. Waschversuche.

5. Abb. 2. Punkte, punktierte Kurve.

Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,003, NaCl 0,1505 Molar.

CO_2-Spannung	46,7	91,8	134,9	141,6	173,0
CO_2-Kapazität	31,3	47,6	**57,6**	**60,8**	**75,0**
p_H	7,06	6,91	**6,80**	**6,80**	**6,80**
				Knick.	

6. Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,003, NaCl 0,1505 Molar.

CO_2-Spannung	36,5	75,2	115,3	149,3	202,7
CO_2-Kapazität	27,1	43,6 41,5	**47,3**	**62,7**	69,5
p_H	7,11	6,97 6,95	**6,79**	**6,79**	6,68
			Knick.		

7. Abb. 2. Ringe, gestrichelte Kurve.

Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,015, NaCl 0,1325 Molar.

CO_2-Spannung	48,6	83,2	118,9	145,8	189,2	244,8
CO_2-Kapazität	32,7	47,8	**53,2**	**66,6**	72,3	72,8
p_H	7,06	6,98	**6,83**	**6,835**	6,74	6,60
			Knick.			

8. Abb. 2. Liegende Kreuze, gestrichelte Kurve.

Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,04, NaCl 0,095, HCl 0,001 Molar.

CO_2-Spannung	40,7	89,0	100,0	121,0	168,9	198,0
CO_2-Kapazität	17,8 16,0	**33,5**	**36,2**	**47,2**	52,0	53,7
p_H	6,88 6,83	**6,77**	**6,745**	**6,77**	6,64	6,57
			Knick.			

9. Abb. 2. Kreuzringe, ausgezogene Kurve.
Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,0516, NaCl 0,0775, HCl 0,001 Molar.

CO_2-Spannung	59,6	96,3	111,8	146,2	188,7	249,2
CO_2-Kapazität	36,3	43,7	47,7	**46,5**	**60,4**	73,8
		41,2	47,4	**47,7**		
p_H	7,00	6,85	6,81	**6,66**	**6,65**	6,60
		6,82	6,81	**6,67**		
				Knick.	Knick.	

10. Abb. 2. Stehende Kreuze, strichpunktierte Kurve.
Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,1033, HCl 0,0015 Molar.

CO_2-Spannung	39,0	93,5	122,8	162,5	209,4	256,5
CO_2-Kapazität	20,8	32,3	32,0	**34,1**	**49,4**	55,1
		32,4				
p_H	6,97	6,73	6,56	**6,44**	**6,49**	6,43
		6,73		Knick.	Knick.	

11. Abb. 2. Dreistern, punktierte Kurve.
Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,155, HCl 0,0011 Molar.

CO_2-Spannung	50,6	105,8	131,7	151,5	178,4	243,8
CO_2-Kapazität	16,2	**21,4**	**26,1**	**31,1**	**37,7**	**50,4**
	17,0					
p_H	6,72	**6,44**	**6,42**	**6,43**	**6,44**	**6,41**
	6,74	Knick.	Knick.	Knick.	Knick.	Knick.

12. Blutkörperchensuspension in $MgCl_2$ 0,155, HCl 0,0015 Molar.

CO_2-Spannung	55,7	99,3	130.7	157,1	178,8
CO_2-Kapazität	**10,2**	**17,7**	**23,2**	23,0	27,6
p_H	**6,41**	**6,37**	**6,36**	6,22	6,25
	Knick.	Knick.	Knick.		

Calcium.

I. Hämolyseversuche[1]).

13. Defibriniertes Blut + $CaCl_2$ 0,06 Mol + Saponin.

CO_2-Spannung	26,6	54,6	64,2	74,0	100,4
CO_2-Kapazität	20,3	**32,9**	**36,3**	40,5	42,0
			35,0		40,8
p_H	7,14	**7,00**+	**6,97**	6,95	6,81
			6,95		
		Knick.	Knick.		

[1]) Vgl. auch: Diese Zeitschr. **90**, 336. 1918. Versuch Nr. XXVI und XXVII.

II. Waschversuche.

14. Abb. 3. Stehende Kreuze, gestrichelte Kurve.

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,001, NaCl 0,1535 } Molar.

CO_2-Spannung	44,2	101,6	126,4	159,2
CO_2-Kapazität	21,0	**31,2**	**36,4**	42,8
		31,0	**37,1**	43,9
p_H	6,91	**6,66**	**6,62**	6,58
		6,65	**6,63**	
		Knick.		

15. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,001, NaCl 0,1535 } Molar

CO_2-Spannung	47,6	84,8	92,4	120,4	159,1
CO_2-Kapazität	19,1	**25,0**	**26,3**	**37,2**	**49,6**
					48,3
p_H	6,83	**6,65**	**6,63**	**6,66**	**6,65**
					6,65
		Knick.			

16 Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,001, NaCl 0,1535 } Molar.

CO_2-Spannung	42,5	81,3	96,6	123,1	132,0	162,0
CO_2-Kapazität	23,7	28,4	32,4	**37,4**	**38,1**	**48,9**
	22,9		33,0	**38,1**		**50,1**
p_H	6,98	6,74	6,72	**6,65**	**6,62**	**6,63**
				6,66		**6,64**
				Knick.		

17. Abb. 3. Punktringe, ausgezogene Kurve.

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,003, NaCl 0,1505 } Molar.

CO_2-Spannung	47,6	83,0	151,8	165,0	201,0
CO_2-Kapazität	40,0	50,6	**62,4**	**66,3**	73,7
			61,8		
p_H	7,15	6,99	**6,78**	**6,77**	6,71
			6,78		
			Knick.		

18. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,003, NaCl 0,1505 } Molar.

CO_2-Spannung	43,8	90,5	137,3	194,0	212,1
CO_2-Kapazität	42,1	58,0	61,3	**77,8**	**93,5**
	43,5		61,3		
p_H	7,21	7,00	6,82	**6,76**	**6,79**
	7,22		6,82	Knick.	

19. Abb. 3. Punkte, ausgezogene Kurve.

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,0075, NaCl 0,145 } Molar.

CO_2-Spannung	27,4	88,1	133,8	187,7
CO_2-Kapazität	20,2	38,2	41,8	59,2
		37,5	38,9	59,0
p_H	7,12	6,83	6,66	6,64
		6,83	6,63	6,64
			Knick.	

20. Abb 3. Liegende Kreuze, ausgezogene Kurve.

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,015, NaCl 0,1325 } Molar.

CO_2-Spannung	46,9	74,5	93,5	121,6	163,6	197,8
CO_2-Kapazität	22,8	28,7	31,7	32,4	38,4	48,7
		26,6		32,0		46,7
p_H	6,92	6,77	6,72	6,57	6,50	6,52
						6,50
					Knick.	

21. Abb. 3. Ringe, punktierte Kurve.

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,03, NaCl 0,11, HCl 0,0008 } Molar.

CO_2-Spannung	43,8	89,8	143,7	240,7
CO_2-Kapazität	11,7	17,3	28,9	36,1
p_H	6,64	6,42	6,42	6,22
		Knick.		

22. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,03, NaCl 0,11 } Molar.

CO_2-Spannung	24,3	55,3	119,7	187,7	269,7
CO_2-Kapazität	19,1	33,6	42,4	49,5	59,5
	22,6	32,8			
p_H	7,16	7,01	6,73	6,55	6,44
	7,23	7,00			Knick.

23. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,03, NaCl 0,11 } Molar.

CO_2-Spannung	18,9	143,1	190,5	218,4	266,9
CO_2-Kapazität	19.3	56,4	58,5	59,3	67,3
	23,5	52,6			
p_H	7,28	6,76	6,70	6,56	6,51
	7,34	6,73		Kein Knick.	

24. Abb. 3. **Kreuzring, ausgezogene Kurve.**

Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,045
NaCl 0,09 } Molar.
HCl 0,0003 }

CO_2-Spannung	38,7	99,9	145,5	162,3	196,3	247,0
CO_2-Kapazität	11,5	**19,8**	**29,1**	**32,8**	**37,6**	**49,1**
p_H	6,69	**6,43**	**6,42**	**6,42**	**6,38**	**6,39**
		Knick.				

25. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,045 } Molar.
NaCl 0,09 }

CO_2-Spannung	9,4	49,2	120,3	146,1	190,0	246,6
CO_2-Kapazität	7,6	21,0	35,5 33,9	35,0	**41,1**	**46,4**
p_H	7,21	6,86	6,63 6,61	6,52	**6,45**	**6,36**
					Knick.	

26. Blutkörperchensuspension in $CaCl_2$ 0,1033 } Molar.
HCl 0,0001 }

CO_2-Spannung	46,9	108,9	174,3
CO_2-Kapazität	5,3	**22,5**	25,0 25,3
p_H	6,12?	**6,45** Knick.	6,20

Strontium.

I. Hämolyseversuche.

27. Abb. 4. Liegende Kreuze, ausgezogene Kurve.

Defibriniertes Blut + $SrCl_2$ 0,005 Mol. + Saponin.

CO_2-Spannung .	37,3	55,9	62,3	67,6	84,5	97,9	125,3
CO_2-Kapazität .	36,9 35,6	41,9	43,2	**44,0**	**56,7**	59,6	61,8
p_H	7,23 7,22	7,09	7,06	**7,03**	**7,03**	6,97	6,87
				Knick.			

28. Abb. 4. Punkte, strichpunktierte Kurve.

Defibriniertes Blut + $SrCl_2$ 0,01 Mol. + Saponin.

CO_2-Spannung .	35,3	54,4	66,3	83,4	95,5	123,3	132,8
CO_2-Kapazität .	35,5	44,2 42,2	43,7	44,9	44,2	**49,1**	**54,0** **56,3**
p_H	7,24	7,12	7,03	6,93	6,86	6,78	**6,78** **6,80**
						Knick.	

29. Abb. 4. Stehende Kreuze, punktierte Kurve.
Defibriniertes Blut + $SrCl_2$ 0,04 Mol. + Saponin.

CO_2-Spannung	65,2	84,7	93,9	112,7	145,1	184,0
CO_2-Kapazität	47,8	47,8	50,3	50,8	**61,0**	68,8
	44,7	47,8	47,8		**59,1**	
p_H	7,07	6,95	6,92	6,87	**6,79**	6,73
	7,05	6,95	6,90		**6,78**	
					Knick.	

30. Abb. 4. Ringe, gestrichelte Kurve.
Defibriniertes Blut + $SrCl_2$ 0,06 + Saponin.

CO_2-Spannung	27,1	49,6	66,7	108,3	117,0	155,3
CO_2-Kapazität	28,3	36,7	36,8	**47,3**	**48,8**	54,1
	27,7	36,9	39,7		**46,5**	
p_H	7,27	7,10	6,95	**6,83**	**6,80**	6,70
			6,99		**6,78**	
				Knick.		

II. Waschversuche.

31. Abb. 5. Punkte, ausgezogene Kurve.
Blutkörperchensuspension in $SrCl_2$ 0,001, NaCl 0,1535 Molar.

CO_2-Spannung	24,6	50,6	81,7	110,9	137,3	160,7
CO_2-Kapazität	17,6	26,0	**33,1**	**44,1**	46,7	51,7
			34,3			
p_H	7,12	6,94	**6,79**	**6,78**	6,70	6,66
			6,81			
			Knick.			

32. Abb. 5. Liegende Kreuze, ausgezogene Kurve.
Blutkörperchensuspension in $SrCl_2$ 0,003, NaCl 0,1505 Molar.

CO_2-Spannung	24,6	48,7	81,3	144,9	156,7
CO_2-Kapazität	16,2	26,2	**34,0**	48,7	49,2
			35,2		
p_H	7,08	6,96	**6,81**	6,69	6,65
			6,83		
			Knick.		

33. Abb. 5. Ringe. gestrichelte Kurve.
Blutkörperchensuspension in $SrCl_2$ 0,015, NaCl 0,1325 Molar.

CO_2-Spannung	26,7	57,7	79,7	90,3	111,5	166,9	196,4
CO_2-Kapazität	16,3	23,5	32,0	32,8	32,2	**40,1**	**51,7**
					34,2	**40,7**	**46,8**
p_H	7,04	6,83	6,80	6,75	6,65	**6,51**	**6,55**
						6,52	**6,50**
						Knick.	

Barium.

I. Hämolyseversuche[1]).

34. Defibriniertes Blut + $BaCl_2$ 0,01 Mol. + Saponin.

CO_2-Spannung	32,0	51,2	59.0	70,1	80,4	107,5
CO_2-Kapazität	26,1	29,9	35,2 36,3	45,1	45,2	46,9 45,4
p_H	7,15	6,995	6,995 7,01	7,02	6,95	6,82

Knick. (6,995 – 7,02)

35. Defibriniertes Blut + $BaCl_2$ 0,06 Mol. + Saponin.

CO_2-Spannung	23,1	37,0	59,9	105,7	133,6	157,3	186,6
CO_2-Kapazität	25,4	32,2	36,5	43,6	53,4 52,0	57,2	59,7 61,2
p_H	7,30	7,18	7,00	6,80	6,78 6,76+	6,72	6,65 6,66

Knick. (6,80 – 6,78)

II. Waschversuche.

36. Abb. 6. Liegende Kreuze, gestrichelte Kurve.
Blutkörperchensuspension in $BaCl_2$ 0,015, NaCl 0,1325, HCl 0,0008 Molar.

CO_2-Spannung	35,3	63,5	74,1	98,0	105,7	121,1	156,6
CO_2-Kapazität	28,7 28,3	31,4	31,5	41,4	47,0	51,5 52,7	52,7
p_H	7,15 7,15	6,91	6,83	6,82	6,83	6,81 6,82	6,68

Knick. (6,83 – 6,83)

37. Abb. 6. Ringe, ausgezogene Kurve.
Blutkörperchensuspension in $BaCl_2$ 0,06, NaCl 0,065, HCl 0,0015 Molar.

CO_2-Spannung	43,2	78,6	154,0
CO_2-Kapazität	23,4 23,1	33,2	49,6
p_H	6,97 6,97	6,83 Knick.	6,66

38. Abb. 6. Stehende Kreuze, punktierte Kurve.
Blutkörperchensuspension in $BaCl_2$ 0,1033, HCl 0,0015 Molar.

CO_2-Spannung	39,1	60,2	97,2	144,9
CO_2-Kapazität	12,0	17,7	27,5	34,5
p_H	6,71	6,67	6,63	6,51

Knick. (6,67 – 6,63)

[1]) Vgl. auch: Diese Zeitschr. 90, 336. 1918. Versuch Nr. XXVIII

39. Abb. 6. Punkte, ausgezogene Kurve.

Blutkörperchensuspension in $BaCl_2$ 0,155, HCl 0,0012 Molar.

CO_2-Spannung	59,5	110,9	134,6	165,4	196,7
CO_2-Kapazität	15,0	22,5	27,0	31,8	38,5
p_H	6,59	6,44	6,42	6,39	6,39
		Knick.			

40. Blutkörperchensuspension in $BaCl_2$ 0,155, HCl 0,001 Molar.

CO_2-Spannung	52,5	90,6	153,5	162,8	181,8
CO_2-Kapazität	21,2	28,0	35,6	34,2	36,0 35,2
p_H	6,83	6,67	6,50	6,44	6,40 6,39 Knick.

Ringerlösung.

41. Blutkörperchensuspension in KCl 0,00564, $CaCl_2$ 0,00216, NaCl 0,146 Molar.

CO_2-Spannung	27,5	59,5	119,0	155,2
CO_2-Kapazität	23,6	32,0	50,4	63,1
p_H	7,29	6,95	6,81 Knick.	6,52

42. Blutkörperchensuspension in KCl 0,0032, $CaCl_2$ 0,00336, NaCl 0,146 Molar.

CO_2-Spannung	25,0	59,3	86,7	94,8	119,7
CO_2-Kapazität	20,8 18,8	25,0	37,0 38,9	39,7	42,4 42,4
p_H	7,18 7,14	6,88	6,83 6,85	6,81	6,73 6,73
			Knick.		

Beiträge zur Kenntnis der Gallensekretion. I.

Von

Ernst Neubauer (Karlsbad).

(Aus der I. medizinischen Klinik in Wien
[Vorstand: Prof. K. F. Wenckebach.])

(*Eingegangen am 12. Juni 1920.*)

Mit 4 Abbildungen im Text.

In einer sehr großen Zahl von Cholelithiasisfällen sind Symptome zu beobachten, die auf einen abnormen Zustand des autonomen und des sympathischen Nervensystems zurückgeführt werden können; auf diese Erscheinungen wurde im Laufe des letzten Jahrzehntes neuerdings die Aufmerksamkeit besonders durch die Arbeiten von Eppinger und Hess[1]) und von A. Thiess[2]) gerichtet.

Besonders auffällig sind diese Symptome während eines Gallensteinanfalles; dabei gewinnt man den Eindruck, daß sie eine Begleiterscheinung oder einen Folgezustand der Vorgänge in den Gallenwegen darstellen. Wenn z. B. nach einer Morphiuminjektion das bei Gallensteinkoliken nicht selten auftretende Symptom der kalten Hände und Füße mit den Schmerzen schwindet, oft so prompt, daß man aus dem Schwinden dieser Erscheinung geradezu das Nachlassen der Kolikschmerzen und die erforderliche Morphiumdosis erschließen kann, so liegt es nahe, das Symptom als eine Folge des Anfalles anzusehen. Nun sind aber auch im Intervall zwischen den Anfällen derartige Symptome sehr häufig zu finden, neben anderen vor allem Bradykardie, Obstipation, Hyperacidität. Diese Zustände in der Latenzzeit scheinen nun keineswegs eine Folge des Vorhandenseins von Konkrementen in den Gallenwegen zu sein, man hat vielmehr ganz den Eindruck, als ob sie der Konkrementbildung koordiniert oder gar als Teilerscheinung eines Allgemeinzustandes aufzufassen wären, welcher zur Gallensteinbildung disponiert.

---

[1]) Die Vagotonie. Samml. klin. Abhandl. über Pathol. u. Therap. der Stoffwechsel- u. Ernährungsstörungen. Herausgegeben v. Noorden. 9. u. 10. Heft. 1910.

[2]) Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **27**, 389. 1914.

Als nächste Ursache für die Bildung von Gallensteinen müssen wir jedenfalls eine Veränderung der Beschaffenheit der Galle gegenüber der Norm annehmen. Außer an die Möglichkeit, daß eine in normaler Beschaffenheit von der Leber gebildete Galle sekundär Veränderungen erfahre, ist natürlich auch daran zu denken, daß abnorme Erregungszustände im autonomen und sympathischen Nervensystem direkt einen Einfluß auf die gallenbildende Tätigkeit der Leberzellen ausüben. Nun ist freilich gerade für die Leber anders als für die Mund- und Bauchspeicheldrüsen eine Veränderung ihrer sekretorischen Funktion und ihres Sekretionsproduktes unter verschieden starkem Einfluß des Vagus und Sympathicus kaum etwas bekannt. Heidenhain[1]) beantwortet die Frage nach einem direkten Einfluß des Nervensystems auf die Gallensekretion in negativem Sinne, künftiger Forschung es überlassend, die Frage zu entscheiden, ob die Leberzellen unabhängig von jedem Nerveneinfluß oder unter der Herrschaft automatischer Nervenzentren der Leber ihre sekretorischen Aufgaben erfüllen. Arthaud und Butte[2]) sehen auf Grund ihrer Versuche (Reizung des peripheren Vagusendes in der Höhe der Kardia verlangsamt die Gallenabscheidung) einen direkten Einfluß des Vagus auf die Gallensekretion als erwiesen an. Zu dem entgegengesetzten Ergebnis einer Förderung der Sekretion der Galle, und zwar sowohl des Gallenwassers als ihrer festen Bestandteile, kam M. Eiger[3]) in Versuchen mit intrathorakaler Vagusreizung bei Hunden. Verwertbare Angaben über die Beeinflussung der Gallensekretion durch Pharmaka mit bekanntem Angriffspunkt im autonomen oder sympathischen Nervensystem liegen kaum vor. Nur einer jüngst erschienenen Arbeit muß hier gedacht werden; J. Bauer und E. Spiegel[4]) haben an klinischen Fällen die Möglichkeit und Art der pharmakologischen Beeinflussung der Konzentration freilich nur eines für die vorliegende Frage vielleicht minder wichtigen Gallenbestandteils, des Bilirubins, im Blute festgestellt.

Im Zusammenhange mit anderen Untersuchungen über die sekretorische Tätigkeit der Leber habe ich in den Jahren 1913 und 1914 an der Klinik von Noorden, 1918 und 1919 an der Klinik Wenckebach Untersuchungen in der angeführten Richtung an Kaninchen angestellt. Diese Tiere wurden bisher nur selten in größerem Maße für derartige Untersuchungen verwendet. Man wählte meist Hunde mit permanenter Gallenfistel, ob zwar von verschiedenen Seiten auf die Schwierigkeiten bei der Deutung der Versuchsergebnisse hingewiesen wurde, die durch die komplizierte Gallenausscheidungskurve dieser Gallenfistelhunde

---

[1]) Herrmanns Handb. d. Physiol. 5, H. 1.
[2]) Compt. rend. de la soc. de biol. 42, 44. 1890.
[3]) Zeitschr. f. Biol. 66, neue Folge 48, 229. 1916.
[4]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. 129, 17, 1919

gegeben sind. Dagegen betont Bürker[1]), der in einer größeren Versuchsreihe Kaninchen mit temporärer Gallenfistel verwendete, die überaus große Regelmäßigkeit der Lebersekretion dieser Tiere, die freilich bei dem geringen Sekretionsdruck leicht durch ungeeignete Lagerung der Kanüle, verschiedene Füllung und Lagerung der Baucheingeweide, Störungen der Atmung und Unruhe des Tieres, wenn auch nur scheinbar, gestört werden kann. Die große Regelmäßigkeit der Gallenbildung ist vielleicht darin begründet, daß Kaninchen als Pflanzenfresser sich fast andauernd im Zustande der Verdauung befinden. Das Gewicht der verwendeten Tiere betrug um 2000 g. Sie wurden mit Abfällen der Krankenkost (Kartoffeln, Reis, Rüben, Kraut) gleichmäßig, in den Vorkriegsjahren reichlicher als später gefüttert, erhielten ihre letzte Futterration um 10 Uhr vormittags des Versuchstages. 4—5 Stunden später wurden sie mit Urethan (1,2 g pro Kilogramm Tier) in 10 proz. Lösung narkotisiert. Dann wurde eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, das Abdomen in der Mittellinie eröffnet, der Gallenblasengang an seinem Gallenblasenende abgeklemmt, in den Gallengang eine Glaskanüle mit Schlauchleitung eingebunden und die abfließende Galle in Meßzylindern aufgefangen und gemessen, in manchen Fällen zeitweise auch die in bestimmten Zeiträumen ausfließenden Gallentropfen evtl. mit Hilfe eines elektrischen Tropfenzählers gezählt. Das Abdomen wurde teilweise durch Klemmen wieder geschlossen und durch Kompressen und Bestrahlung mit einer Glühlampe vor Abkühlung geschützt. Fast in allen Versuchen wurde künstliche Atmung mit einem Meyerschen Respirationsapparat durchgeführt. Bestimmt wurde außer der Gallenmenge in verschiedenen aus den Tabellen ersichtlichen Zeitperioden das spezifische Gewicht dieser Gallenportionen, ihr Trockenrückstand, ihre Oberflächenspannung und Viscosität. Die Bestimmung der beiden letzten Größen erfolgte mit dem Viscostagonometer von Traube. Die als Oberflächenspannung angeführten Werte entsprechen dem Produkt aus dem Verhältnis der Tropfengröße der Galle zu dem des Wassers von gleicher Temperatur mit dem pyknometrisch ermittelten spezifischen Gewicht der Galle für diese Temperatur; als Viscosität habe ich das Verhältnis der Ausflußgeschwindigkeit der Galle zu der

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 83, 241. 1901

von destilliertem Wasser angeführt. Während die Werte der Oberflächenspannung sich mit großer Sicherheit und Genauigkeit feststellen ließen, gilt dies für die der Viscosität nicht in ganz gleichem Ausmaße. Hier kommen Schwankungen zwischen den Werten einzelner Gallenportionen vor, die vielleicht nur dadurch hervorgerufen werden, daß allerfeinste in der sonst klaren Galle suspendierte Teilchen die Capillare des Apparates verengern; gleichwohl wurde von einer Filtration oder Sedimentierung abgesehen, um nicht andere Fehlerquellen einzuführen. — Auch auf einen etwaigen Zuckergehalt der Galle wurde geachtet. Im folgenden werden stets nur einige Versuche jeder Reihe tabellarisch angeführt; die gezogenen Schlußfolgerungen sind die Resultate aus allen vorgenommenen Versuchen.

Normalversuche.

Versuch 1: Männliches Kaninchen, 1900 g, erhält um 2^h 25′ 23 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 3^h bis 3^h 30′ wird in eine Jugularvene eine Kanüle eingebunden, der Gallenblasengang an der Gallenblase abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt; die aus der Gallengangskanüle abtropfende Galle wird von 3^h 40′ an gesammelt.

Versuch 2: Weibliches Kaninchen, 1900 g, erhält um 2^h 15′ 24 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 3^h bis 3^h 25′ wird eine Jugularvenenkanüle eingebunden, der Gallenblasengang an seinem Gallenblasenende abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die abtropfende Galle wird von 3^h 15 an gesammelt.

Versuch 3: Weibliches Kaninchen, 2000 g, erhält um 1^h 50′ 24 ccm einer 10 proz Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 2^h 20′ bis 2^h 35′ wird eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, der Ductus cysticus an der Gallenblase abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die abfließende Galle wird von 2^h 40′ an gesammelt.

Versuch 4: Weibliches Kaninchen, 2000 g, erhält um 1^h 35′ 25 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 2^h 5′ bis 2^h 15′ wird eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, der Gallenblasengang an der Gallenblase abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die abfließende Galle wird von 2^h 20′ an gesammelt.

Die Normalversuche an Kaninchen mit der oben angeführten Anordnung ohne sonstigen Eingriff gaben folgende Resultate:

1. Die Gallenmenge sinkt innerhalb der ersten drei halben Stunden beträchtlich und stellt sich nach dieser Zeit auf ein

Fortsetzung auf S. 89.

Tabelle zu Versuch 1.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächen-spannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand			Viscosität	Reduktion
				in %	in g	in g für 15 Min. berechn.		
$3^h 40'$—$3^h 55'$	4,3							
$3^h 55'$—$4^h 10'$	2,8							
$3^h 40'$—$4^h 10'$	7,1	619,3	1009,7	2,42	0,1718	0,0859	108,8	
$4^h 10'$—$4^h 25'$	1,8							
$4^h 25'$—$4^h 40'$	1,7							
$4^h 40'$—$4^h 55'$	1,6							
$4^h 10'$—$4^h 55'$	5,1	621,8	1009,4	2,13	0,1086	0,0362	109,6	
$4^h 55'$—$5^h 10'$	1,4							
$5^h 10'$—$5^h 25'$	1,35							
$5^h 25'$—$5^h 40'$	1,35							
$5^h 40'$—$5^h 55'$	1,4							
$4^h 55'$—$5^h 55'$	5,4	621,4	1009,6	2,02	0,1091	0,0273	106,7	
$5^h 55'$—$6^h 10'$	1,2							
$6^h 10'$—$6^h 25'$	1,15							
$6^h 25'$—$6^h 40'$	1,25							
$6^h 40'$—$6^h 55'$	1,1							
$5^h 55'$—$6^h 55'$	4,7	623,3	1009,3	1,89	0,0888	0,0222	103,8	

Tabelle zu Versuch 2.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächen-spannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand			Viscosität	Reduktion
				in %	in g	in g für 15 Min. berechn.		
$3^h 15'$—$3^h 30'$	2,4							
$3^h 30'$—$3^h 45'$	2,5							
$3^h 15'$—$3^h 45'$	4,9	630,1	1011,3	2,18	0,1068	0,0534	104,1	0
$3^h 45'$—4^h	2,3							
4^h —$4^h 15'$	2,2							
$4^h 15'$—$4^h 30'$	2,1							
$4^h 30'$—$4^h 45'$	1,8							
$3^h 45'$—$4^h 45'$	8,4	630,2	1011,0	2,17	0,1823	0,0456	105,1	0
$4^h 45'$—5^h	1,3							
5^h —$5^h 15'$	1,5							
$5^h 15'$—$5^h 30'$	1,6							
$5^h 30'$—$5^h 45'$	1,6							
$5^h 45'$—6^h	1,5							
$4^h 45'$—6^h	7,5	629,1	1010,6	2,21	0,1657	0,0331	105,8	Spur
6^h —$6^h 15'$	1,3							
$6^h 15'$—$6^h 30'$	1,3							
$6^h 30'$—$6^h 45'$	1,3							
$6^h 45'$—7^h	1,1							
6^h —7^h	5,0	628,1	1010,6	2,18	0,1090	0,0153	104,7	Spur

Tabelle zu Versuch 3.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berechn.	Viscosität	Reduktion
$2^h\,45'$—$2^h\,50'$	0,5								
$2^h\,50'$—$2^h\,55'$	0,5	1,6							
$2^h\,55'$—3^h	0,6								
3^h —$3^h\,5'$	0,6								
$3^h\,5'$ —$3^h\,10'$	0,6	1,7							
$3^h\,10'$—$3^h\,15'$	0,5								
$2^h\,45'$—$3^h\,15'$		5,3	629,8	1011,2	2,16	0,1145	0,0572	105,4	0
$3^h\,15'$—$3^h\,20'$	0,3								
$3^h\,20'$—$3^h\,25'$	0,4	1,2							
$3^h\,25'$—$3^h\,30'$	0,5								
$3^h\,30'$—$3^h\,35'$	0,5								
$3^h\,35'$—$3^h\,40'$	0,4	1,3							
$3^h\,40'$—$3^h\,45'$	0,4								
$3^h\,45'$—$3^h\,50'$	0,4								
$3^h\,50'$—$3^h\,55'$	0,4	1,2							
$3^h\,55'$—4^h	0,4								
$3^h\,15'$—4^h		3,7	630,4	1010,5	2,04	0,0755	0,0252	102,9	0
4^h —$4^h\,5'$	0,3								
$4^h\,5'$ —$4^h\,10'$	0,2	0,8							
$4^h\,10'$—$4^h\,15'$	0,3								
$4^h\,15'$—$4^h\,20'$	0,3								
$4^h\,20'$—$4^h\,25'$	0,3	0,8							
$4^h\,25'$—$4^h\,30'$	0,2								
$4^h\,30'$—$4^h\,35'$	0,4								
$4^h\,35'$—$4^h\,40'$	0,5	1,1							
$4^h\,40'$—$4^h\,45'$	0,2								
$4^h\,45'$—$4^h\,50'$	0,3								
$4^h\,50'$—$4^h\,55'$	0,4	1,0							
$4^h\,55'$—5^h	0,3								
4^h —5^h		3,7	630,2	1010,3	1,98	0,0733	0,0183	102,3	0
5^h —$5^h\,15'$		1,0							
$5^h\,15'$—$5^h\,30'$		1,05							
$5^h\,30'$—$5^h\,45'$		1,05							
$5^h\,45'$—6^h		1,05							
5^h —6^h		4,15	631,9	1010,1	1,90	0,0788	0,0197	102,9	0
6^h —$6^h\,15'$		1,05							
$6^h\,15'$—$6^h\,30'$		1,05							
$6^h\,30'$—$6^h\,45'$		1,05							
$6^h\,45'$—7^h		1,1							
6^h —7^h		4,25	635,4	1009,8	1,79	0,0761	0,0190	102,3	0
7^h —$7^h\,15'$		1,2							
$7^h\,15'$—$7^h\,30'$		1,3							
$7^h\,30'$—$7^h\,45'$		1,35							
$7^h\,45'$—8^h		1,35							
7^h —8^h		5,2	632,7	1009,5	1,69	0,0879	0,0219	102,5	0

Tabelle zu Versuch 4.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Min. berechn.	Viscosität	Reduktion
$2^h 20'$—$2^h 25'$	1,5	4,3							
$2^h 25'$—$2^h 30'$	1,5								
$2^h 30'$—$2^h 35'$	1,3								
$2^h 35'$—$2^h 40'$	1,1	3,1							
$2^h 40'$—$2^h 45'$	1,0								
$2^h 45'$—$2^h 50'$	1,0								
$2^h 20'$—$2^h 50'$		7,4	633,6	1010,1	1,82	0,1347	0,0673	103,8	0
$2^h 50'$—$2^h 55'$	0,8	2,6							
$2^h 55'$—3^h	0,9								
3^h —$3^h 5'$	0,9								
$3^h 5'$ —$3^h 10'$	0,85	2,6							
$3^h 10'$—$3^h 15'$	0,85								
$3^h 15'$—$3^h 20'$	0,9								
$3^h 20'$—$3^h 25'$	0,9	2,3							
$3^h 25'$—$3^h 30'$	0,6								
$3^h 30'$—$3^h 35'$	0,8								
$2^h 50'$—$3^h 35'$		7,5	631,6	1009,9	1,74	0,1305	0,0435	103,8	0
$3^h 35'$—$3^h 40'$	0,6	2,1							
$3^h 40'$—$3^h 45'$	0,7								
$3^h 45'$—$3^h 50'$	0,8								
$3^h 50'$—$3^h 55'$	0,7	2,1							
$3^h 55'$—4^h	0,6								
4^h —$4^h 5'$	0,8								
$4^h 5'$ —$4^h 10'$	0,7	2,1							
$4^h 10'$—$4^h 15'$	0,7								
$4^h 15'$—$4^h 20'$	0,7								
$3^h 35'$—$4^h 20'$		6,3	633,2	1009,8	1,71	0,1077	0,0359	103,0	0
$4^h 20'$—$4^h 35'$		1,6							
$4^h 35'$—$4^h 50'$		2,2							
$4^h 50'$—$5^h 5'$		2,0							
$4^h 20'$—$5^h 5'$		5,8	633,1	1009,7	1,62	0,0940	0,0313	102,7	0
$5^h 5'$ —$5^h 20'$		2,0							
$5^h 20'$—$5^h 35'$		2,0							
$5^h 35'$—$5^h 50'$		1,7							
$5^h 50'$—$6^h 5'$		1,6							
$5^h 5'$ —$6^h 5'$		7,3	634,3	1009,6	1,56	0,1134	0,0283	102,7	
$6^h 5'$ —$6^h 20'$		1,8							
$6^h 20'$—$6^h 35'$		1,8							
$6^h 35'$—$6^h 50'$		2,0							
$6^h 50'$—$7^h 5'$		1,5							
$6^h 5'$ —$7^h 5'$		7,1	634,4	1009,6	1,51	0,1072	0,0268	102,7	0

Niveau ein, das unter kleinen periodischen, schon von Bürker[1]) beobachteten Schwankungen stundenlang beibehalten wird, meist mit einer geringen Tendenz zum weiteren Abfall. Die in benachbarten Perioden von 5—15 Minuten Dauer und, nach Ablauf der ersten drei halben Stunden, auch in größeren Zeiträumen sezernierten Gallenmengen stehen einander sehr nahe.

2. Das spezifische Gewicht der Galle, um 1010 in geringem Ausmaß schwankend, nimmt mit der Versuchsdauer langsam ab.

3. Der prozentische Gallentrockenrückstand liegt bei Versuchsbeginn meist zwischen 2 und 2,5%, die für viertelstündige Perioden berechnete absolute Trockenrückstandsmenge zwischen 0,04 und 0,08 g; beide Werte sinken mit der Versuchsdauer.

4. Die Oberflächenspannung zeigt einen sehr konstanten Normalwert, der in 32 Versuchen bei Versuchsbeginn zwischen 617 und 631 liegt, nur zweimal darunter (niedrigster beobachteter Wert 609) und dreimal darüber (höchster beobachteter Wert 633,8). Während des Normalversuchs hält sich die Oberflächenspannung auf annähernd gleicher Höhe, gewöhnlich mit einer geringen Tendenz zum Anstieg; der höchste im Verlauf eines Normalversuchs beobachtete Wert war 635,4. — Aus diesem Verhalten der Oberflächenspannung läßt sich mit größter Wahrscheinlichkeit ein Konstantbleiben oder eine geringe Abnahme der oberflächenaktiven Bestandteile der Galle also hauptsächlich der gallensauren Salze erschließen, zumal eine Versuchsreihe, in der Kaninchengalle einerseits mit destilliertem Wasser auf das 2—64fache verdünnt, andererseits durch Einengen oder durch Zusatz von Taurocholsäure konzentrierter gemacht wurde, ergab, daß mit der Konzentrationszunahme eine Abnahme, mit der Verdünnung ein Anstieg der Oberflächenspannung einhergeht[2]);

[1]) l. c.

[2]) Daß eine Konzentrationszunahme mit einem Abfall der Oberflächenspannung, eine Verdünnung mit einem Anstieg derselben einhergeht, war nicht von vornherein selbstverständlich, da Versuche von G. Buglia*), die ich ergänzte, für Lösungen gallensaurer Salze nicht in allen Fällen so einfache Verhältnisse zeigten. So ergaben Lösungen von Natrium glycocholicum Kahlbaum eine Oberflächenspannungskurve, die von 6—4% einen ganz geringen Anstieg, von 4—1,75% einen geringen Abfall, von 1,75—0,25 ein steiles Absinken, und von da an einen noch steileren Anstieg zeigt; bei 0,12% hat die Kurve die Höhe der 1,75proz. Lösung erreicht, ist

*) Diese Zeitschr. 22, 1. 1909

eine gewisse Bedeutung könnte noch der von G. Bayer[1]) festgestellten Tatsache zukommen, daß an sich nicht oberflächenaktive anorganische Salze in dem Sinn wirken, daß eine Zunahme ihrer Konzentration die Oberflächenwirkung der Gallensäuren steigert.

5. Die Viscosität der Galle liegt um 103 (Wasser = 100).

6. Die Galle war in der Regel zuckerfrei, während der Harn am Ende des Versuchs ausnahmslos Zucker enthielt. In einigen Fällen, fast ausschließlich in den Vorkriegsjahren mit ihrer reichlicheren Fütterung, gaben Gallenportionen, die meist nicht vom Versuchsbeginn stammten, eine deutliche Reduktion Fehlingscher Lösung. Die Angabe Naunyns[2]), daß Zucker ein normaler Gallenbestandteil ist, vermag ich nicht zu bestätigen, wenigstens nicht soweit Mengen in Betracht kommen, die mit einfachster Methodik nachweisbar sind.

Waren so Werte für den normalen Ablauf der Gallensekretion festgestellt, so sollten weiter etwaige Änderungen im Verhalten der Galle unter gesteigerter Vagus- und Sympathicuswirkung untersucht werden. Um die Mechanik der Versuchsanordnung nicht durch direkte Reizung der Nerven im Abdomen oder Thorax zu komplizieren, wurden zunächst die Wirkungen von subcutan oder intravenös eingeführten Substanzen beobachtet, deren Angriffspunkt im autonomen oder sympathischen Nervensystem an anderen Erfolgsorganen studiert ist. So wurde in einer Versuchsreihe, nachdem eine Anzahl normaler Gallenportionen aufgefangen war, Pilocarpin sub-

---

bei einer Konzentration von 0,01% noch weit vom Nullpunkt entfernt. Acidum glycocholicum Merck, wiederholt aus Wasser umkrystallisiert, in 2 proz. Natriumcarbonatlösung zeigt eine ähnliche Kurve, aber mit geringerer Abfallszacke zwischen 1,0 und 0,05%. Kaum angedeutet ist diese Zacke bei einem Präparat von S. Bondis synth. Taurocholsäure in 2 proz. Natriumcarbonatlösung, das eine Kurve mit fast horizontalem Schenkel von 1,5—0,1% und fast vertikalem Schenkel bei weiterer Verdünnung gab. Jegliche Abfallszacke fehlte bei Acidum cholalicum Merck in 2 proz. Sodalösung. — Für das Verhalten der Kaninchenlebergalle seien folgende Beispiele angeführt:

Galle auf die Hälfte eingeengt 617,5, native Galle 622,8, Galle auf die Hälfte verdünnt 634,6; native Galle 624,2, verdünnt auf 1/2 632,2, auf 1/4 638,3, auf 1/8 652,3, auf 1/16 696,1, auf 1/32 742.

[1]) Diese Zeitschr. 13, 234. 1908.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u Pharmakol. 3, 157.

Fortsetzung auf S. 93

Pilocarpinversuche.

Versuch 5: Weibliches Kaninchen, 1900 g, erhält um $2^h 25'$ 23 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von $2^h 50'$ bis $3^h 10'$ wird eine Jugularvenenkanüle eingebunden, der Gallenblasengang an der Gallenblase abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; von $3^h 15'$ an wird Galle gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
$3^h 15'$—$3^h 30'$		2,2								
$3^h 30'$—$3^h 45'$		2,2								
$3^h 15'$—$3^h 45'$		4,4	626,6	1011	2,13	0,0937	0,0469	103,0	0	
$3^h 45'$—4^h		2,0								
4^h —$4^h 5'$	0,7									
$4^h 5'$ —$4^h 10'$	0,6	1,9								
$4^h 10'$—$4^h 15'$	0,6									Um $4^h 20'$ werden 4 mg Pilocarpin hydrochlor. in 0,4 ccm physiol NaCl-Lösung in die Jugularvene injiziert.
$4^h 15'$—$4^h 20'$	0,6									
$4^h 20'$—$4^h 25'$	0,7	1,8								
$4^h 25'$—$4^h 30'$	0,8									
$3^h 45'$—$4^h 30'$		5,7	628,0	1009,3	1,90	0,1083	0,0361	102,0	0	
$4^h 30'$—$4^h 35'$	0,4									$4^h 30'$ starke Salivation.
$4^h 35'$—$4^h 40'$	0,6	1,7								
$4^h 40'$—$4^h 45'$	0,7									$4^h 40'$ Salivation dauert fort.
$4^h 45'$—$4^h 50'$	0,8									Stuhl- und Harnentleerung.
$4^h 50'$—$4^h 55'$	0,7	2,2								
$4^h 55'$—5^h	0,7									
$4^h 30'$—5^h		3,9	632,5	1009,5	2,12	0,0827	0,0413	102,0	0	
5^h —$5^h 5'$	0,7									Um $5^h 15'$ werden 4 mg Piloc. hydrochl. in 0,4 ccm, um $5^h 30'$ 2 mg Pilocarp. hydrochlor. in 0,2 ccm phys. NaCl-Lösung in die Jugularvene injiziert.
$5^h 5'$ —$5^h 10'$	0,8	2,2								
$5^h 10'$—$5^h 15'$	0,7									
$5^h 15'$—$5^h 20'$	0,8									
$5^h 20'$—$5^h 25'$	0,6	2,1								
$5^h 25'$—$5^h 30'$	0,7									
5^h —$5^h 30'$		4,3	632,3	1010,0	2,13	0,0916	0,0459	102,4	0	
$5^h 30'$—$5^h 35'$	0,6									
$5^h 35'$—$5^h 40'$	0,8	2,2								
$5^h 40'$—$5^h 45'$	0,8									$5^h 45'$ breiige Stuhlentleerung.
$5^h 45'$—$5^h 50'$	0,8									
$5^h 50'$—$5^h 55'$	0,7	2,0								
$5^h 55'$—6^h	0,7									
6^h —$6^h 5'$	0,7									
$6^h 5'$ —$6^h 10'$	0,6	1,9								$6^h 10'$ Salivation läßt nach.
$6^h 10'$—$6^h 15'$	0,6									$6^h 15'$ Salivation hat aufgehört.
$5^h 30'$—$6^h 15'$		6,1	629,9	1010,2	2,21	0,1348	0,0449	102,4	0	
$6^h 15'$—$6^h 30'$		0,9								
$6^h 30'$—$6^h 45'$		0,9								
$6^h 45'$—7^h		1,0								
$6^h 15'$—7^h		2,8	628,5	1009,8	2,31	0,0647	0,0216	102,7	0	

Versuch 6: Weibliches Kaninchen, 2200 g, erhält um 2^h 27 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von $2^h 40'$ bis $2^h 55'$ wird eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, der Gallenblasengang an der Gallenblase abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die Galle wird ab 3^h gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
3^h — $3^h 5'$	1,5									
$3^h 5'$ — $3^h 10'$	1,6	4,6								
$3^h 10'$ — $3^h 15'$	1,5									
3^h — $3^h 15'$		4,6	630,4	1010,4	2,15	0,0989	0,0989	103,7	0	
$3^h 15'$ — $3^h 20'$	1,0									
$3^h 20'$ — $3^h 25'$	1,0	3,0								
$3^h 25'$ — $3^h 30'$	1,0									
$3^h 30'$ — $3^h 35'$	1,0									
$3^h 35'$ — $3^h 40'$	1,0	3,0								
$3^h 40'$ — $3^h 45'$	1,0									
$3^h 15'$ — $3^h 45'$		6,0	630,6	1010,2	1,99	0,1194	0,0597	102,7	0	
$3^h 45'$ — $3^h 50'$	0,7									Um $4^h 8'$ werden 1,2 mg Pilocarp. hydrochlor. in 0,75 ccm physiol. NaCl-Lösung in die Jugularvene injiziert.
$3^h 50'$ — $3^h 55'$	0,9	2,4								
$3^h 55'$ — 4^h	0,8									
4^h — $4^h 5'$	1,4									
$4^h 5'$ — $4^h 10'$	0,4	2,5								
$4^h 10'$ — $4^h 15'$	0,7									$4^h 6'$ starke Salivation.
$3^h 45'$ — $4^h 15'$		4,9	630,9	1010,1	2,00	0,0980	0,0490	102,7	0	
$4^h 15'$ — $4^h 20'$	0,8									
$4^h 20'$ — $4^h 25'$	0,6	2,1								
$4^h 25'$ — $4^h 30'$	0,7									
$4^h 30'$ — $4^h 35'$	0,5									
$4^h 35'$ — $4^h 40'$	0,7	2,1								
$4^h 40'$ — $4^h 45'$	0,9									$4^h 45'$ Salivation gering.
$4^h 15'$ — $4^h 45'$		4,2	630,4	1010,4	2,14	0,0899	0,0449	103,7	0	
$4^h 45'$ — 5^h		2,5								
5^h — $5^h 15'$		2,3								
$5^h 15'$ — $5^h 30'$		1,8								$4^h 30'$ Salivation hat aufgehört.
$5^h 30'$ — $5^h 45'$		1,6								
$4^h 45'$ — $5^h 45'$		8,2	626,6	1010,2	2,18	0,1788	0,0447	103,4	0	
$5^h 45'$ — 6^h		1,3								
6^h — $6^h 15'$		1,4								
$6^h 15'$ — $6^h 30'$		1,3								
$6^h 30'$ — $6^h 45'$		1,3								
$5^h 45'$ — $6^h 45'$		5,3	630,8	1010,8	2,09	0,1108	0,0277	103,0	0	
$6^h 45'$ — 7^h		0,8								
7^h — $7^h 15'$		1,2								
$7^h 15'$ — $7^h 30'$		1,2								
$7^h 30'$ — $7^h 45'$		1,1								
$6^h 45'$ — $7^h 45'$		4,3	636,1	1011,3	1,90	0,0817	0,0204	103,7	0	

Versuch 7: Weibliches Kaninchen, 1920 g, erhält um $2^h 5'$ 24 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von $2^h 40'$ bis $2^h 55'$: Jugularvenenkanüle, Abklemmung des Gallenblasenganges an der Gallenblase, Choledochusfistel, künstliche Atmung; ab $3^h 40'$ wird die Galle gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
$3^h 40'$—$3^h 55'$	1,0								
$3^h 55'$—$4^h 10'$	1,1								
$4^h 10'$—$4^h 25'$	1,1								
$4^h 25'$—$4^h 40'$	1,1								
$3^h 40'$—$4^h 40'$	4,3	630,6	1011,2	2,40	0,1032	0,0258	104,4	0	
$4^h 40'$—$4^h 55'$	1,0								Um $5^h 22'$ werden 4 mg Piloc. hydrochlor. in 1 ccm phys. NaCl-Lösung subcut. injiziert.
$4^h 55'$—$5^h 10'$	0,9								
$5^h 10'$—$5^h 25'$	0,8								
$5^h 25'$—$5^h 40'$	1,0								$5^h 30'$ starke Salivat.
$4^h 40'$—$5^h 40'$	3,7	631,4	1010,5	2,17	0,0803	0,0207	103,1	0	
$5^h 40'$—$5^h 55'$	0,8								
$5^h 55'$—$6^h 10'$	0,7								Um $6^h 15'$ werden 4 mg Piloc. hydrochlor. in 1 ccm phys. NaCl-Lösung subcut. injiziert.
$6^h 10'$—$6^h 25'$	0,7								
$6^h 25'$—$6^h 40'$	0,7								
$6^h 40'$—$6^h 55'$	0,65								$6^h 50'$ Salivation nimmt ab.
$6^h 55'$—$7^h 10'$	0,65								
$5^h 40'$—$7^h 10'$	4,1	632,5	1011,0	2,16	0,0799	0,0133	103,8	0	
$7^h 10'$—$7^h 25'$	0,5								
$7^h 25'$—$7^h 40'$	0,4								
$7^h 40'$—$7^h 55'$	0,4								
$7^h 55'$—$8^h 10'$	0,4								
$7^h 10'$—$8^h 10'$	1,7	633,1	1011,5	2,32	0,0394	0,0099	104,6	0	

cutan oder intravenös injiziert. In Versuchen früherer Autoren über die Frage, ob das Pilocarpin cholagog wirke, ergaben sich die verschiedenst möglichen Resultate: die einen erklären es als Cholagogum, andere behaupten, es sei wirkungslos, andere fanden gar eine gallensekretionshemmende Wirkung; Literatur s. bei A. Zeri[1]).

Ergebnisse der Pilocarpinversuche: 1. Die Gallenmenge verhält sich ähnlich wie im Normalversuch, häufig ist aber doch eine geringe cholagoge Wirkung in der Art nachweisbar, daß der Normalabfall verzögert wird oder auch ein mäßiger Anstieg auftritt.

---

[1]) Arch. ital. de biol. **48**, 94. 1907.

Fortsetzung auf S. 96.

Atropinversuche.

Versuch 8: Weibliches Kaninchen, 2350 g, erhält um 2^h 27 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 2^h 30′ bis 2^h 55′: Juguralvenenkanüle, Abklemmung des Gallenblasenganges an der Gallenblase, Choledochusfistel, künstliche Atmung; die Galle wird ab 3^h gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
3^h —3^h 5′	1,2									
3^h 5′ —3^h 10′	1,3	3,6								
3^h 10′—3^h 15′	1,1									
3^h 15′—3^h 20′	1,1									
3^h 20′—3^h 25′	1,2	3,4								
3^h 25′—3^h 30′	1,1									
3^h —3^h 30′		7,0	630,5	1010,2	1,99	0,1393	0,0696	102,0	schwach +	
3^h 30′—3^h 35′	1,0									
3^h 35′—3^h 40′	1,2	3,4								
3^h 40′—3^h 45′	1,2									
3^h 45′—3^h 50′	1,0									
3^h 50′—3^h 55′	0,9	2,9								
3^h 55′—4^h	1,0									
3^h 30′—4^h		6,3	631,8	1010,5	2,02	0,1272	0,0636	104,0	schwach +	
4^h —4^h 5′	0,65									
4^h 5′ —4^h 10′	0,95	2,65								
4^h 10′—4^h 15′	1,05									
4^h 15′—4^h 20′	0,9									Um 4^h 15′ wurden 2,35 mg Atrop. sulfuric. in 1 ccm physiolog. NaCl-Lösung in die Jugularvene injiziert.
4^h 20′—4^h 25′	0,85	2,65								
4^h 25′—4^h 30′	0,9									
4^h —4^h 30′		5,3	632,6	1010,4	1,99	0,1054	0,0527	102,7	schwach +	
4^h 30′—4^h 35′	0,85									
4^h 35′—4^h 40′	0,95	2,7								
4^h 40′—4^h 45′	0,9									
4^h 45′—4^h 50′	0,8									
4^h 50′—4 55′	0,8	2,4								
4^h 55′—5^h	0,8									
4^h 30′—5^h		5,1	633,4	1010,2	1,92	0,0979	0,0490	102,0	Spur	
5^h —5^h 15′		2,3								
5^h 15′—5^h 30′		2,2								
5^h 30′—5^h 45′		2,6								
5^h —5^h 45′		7,1	632,6	1010,0	1,72	0,1221	0,0407	102,0	0	
5^h 45′—6^h		1,7								
6^h —6^h 15′		1,6								
6^h 15′—6^h 30′		2,9								
6^h 30′—6^h 45′		2,0								
6^h 45′—7^h		1,7								
7^h —7^h 15′		1,0								
5^h 45′—7^h 15′		10,9	634,0	1010,0	1,73	0,1886	0,0314	104,0	0	

Versuch 9: **Männliches Kaninchen, 1900 g, erhält um $1^h\,50'$ 23 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von $2^h\,15'$ bis $2^h\,30'$: Jugularvenenkanüle, Abklemmung des Gallenblasenganges an seinem Gallenblasenende, Choledochusfistel, künstliche Atmung; die Galle wird** von $2^h\,45'$ an gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand			Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
					in %	in g	in g für 15 Minuten berechnet			
$2^h\,45'$—$2^h\,50'$	0,7									
$2^h\,50'$—$2^h\,55'$	0,7	2,2								
$2^h\,55'$—3^h	0,8									
3^h—$3^h\,5'$	0,7									
$3^h\,5'$—$3^h\,10'$	0,6	1,9								
$3^h\,10'$—$3^h\,15'$	0,6									
$2^h\,45'$—$3^h\,15'$		4,1	633,7	1010,0	1,74	0,0713	0,0357	102,2	0	
$3^h\,15'$—$3^h\,20'$	0,4									
$3^h\,20'$—$3^h\,25'$	0,6	1,5								
$3^h\,25'$—$3^h\,30'$	0,5									
$3^h\,30'$—$3^h\,35'$	0,6									
$3^h\,35'$—$3^h\,40'$	0,5	1,7								Um $3^h\,32'$ werden 3 cg Atropin. sulfur. in 3 ccm phys. NaCl-Lösung in die Jugularvene injiziert.
$3^h\,40'$—$3^h\,45'$	0,6									
$3^h\,15'$—$3^h\,45'$		3,2	636,7	1010,4	1,75	0,0560	0,0280	101,3	0	
$3^h\,45'$—$3^h\,50'$	0,3									
$3^h\,50'$—$3^h\,55'$	0,3	0,95								
$3^h\,55'$—4^h	0,35									
4^h—$4^h\,5'$	0,35									
$4^h\,5'$—$4^h\,10'$	0,35	1,00								
$4^h\,10'$—$4^h\,15'$	0,3									
$4^h\,15'$—$4^h\,20'$	0,3									
$4^h\,20'$—$4^h\,25'$	0,3	0,95								
$4^h\,25'$—$4^h\,30'$	0,35									
$4^h\,30'$—$4^h\,35'$	0,3									
$4^h\,35'$—$4^h\,40'$	0,3	0,90								
$4^h\,40'$—$4^h\,45'$	0,3									
$3^h\,45'$—$4^h\,45'$		3,8	637,1	1009,8	1,86	0,0707	0,0177	101,6	0	
$4^h\,45'$—5^h		0,9								
5^h—$5^h\,15'$		0,8								
$5^h\,15'$—$5^h\,30'$		0,75								
$5^h\,30'$—$5^h\,45'$		0,8								
$4^h\,45'$—$5^h\,45'$		3,25	633,0	1010,1	1,88	0,0611	0,0153	104,4	0	
$5^h\,45'$—6^h		0,75								
6^h—$6^h\,15'$		0,8								
$6^h\,15'$—$6^h\,30'$		0,8								
$6^h\,30'$—$6^h\,45'$		0,75								
$5^h\,45'$—$6^h\,45'$		3,1	638,0	1010,1	1,79	0,0555	0,0139	102,9	0	
$6^h\,45'$—7^h		0,6								
7^h—$7^h\,15'$		0,7								
$7^h\,15'$—$8^h\,15'$		2,9								
$6^h\,45'$—$8^h\,15'$		4,1	635,2	1010,1	1,74	0,0713	0,0119	103,8	0	

2. Das spezifische Gewicht der Galle hat im Gegensatz zum Normalversuch eine Tendenz zum Anstieg.

3. Der prozentische Gallentrockenrückstand steigt mäßig, meist in der Art, daß das normale Absinken ausbleibt, die für viertelstündige Perioden berechnete absolute Trockenrückstandsmenge sinkt langsamer als im Normalversuch.

4. Die Oberflächenspannung und

5. die Viscosität bleiben unbeeinflußt.

6. Die Galle war stets zuckerfrei.

Die Pilocarpingalle ist also etwas konzentrierter als die Normalgalle; dabei ist ihre Oberflächenspannung nicht herabgesetzt, ihre Gallensäurekonzentration demnach wohl nicht erhöht.

In 6 Versuchen, in denen Atropin in Dosen von 1 mg bis 1,6 cg pro Kilogramm Tier intravenös gegeben wurde, also in Dosen, die nach Modrakowski[1]) auf die Sekretion des Hundepankreas in entgegengesetztem Sinne wirken, ergab sich keine deutliche Veränderung in der Menge, dem spezifischen Gewicht, dem prozentischen und absoluten Trockenrückstand, der Oberflächenspannung und Viscosität gegenüber der Norm. Die Galle war zuckerfrei, in einem Falle verschwand nach Atropin in der Galle vorhandener Zucker.

Adrenalin wirkt an allen Organen, besonders auch an den Drüsen mit wenigen Ausnahmen wie Sympathicusreizung. Es steigert die Sekretion der Speicheldrüsen [Langley[2]], das dabei gebildete Sekret hat die Eigenschaften des Sympathicusspeichels; es steigert die Sekretion der Tränendrüse, der Hautdrüsen des Frosches, nicht aber die der Schweißdrüsen. Die Sekretion der Bauchspeicheldrüse läßt es unbeeinflußt, setzt sie herab oder hemmt sie vollständig je nach der Dosis [Gläßner und Pick[3])]; nach Kudrewezki[4]) und Sawitsch[5]) erhält man allerdings nach direkter mechanischer Sympathicusreizung, wenn eine Reizung der in dem Nerven verlaufenden gefäßverengernden Fasern vermieden wird, einen vermehrten an festen Substanzen

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **114**, 487. 1906.

[2]) Journ. of physiol. **27**, 237. 1901.

[3]) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **6**, 313. 1909.

[4]) Zitiert nach Babkin: Die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen. Springer 1914.

[5]) Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels, Heft 1, 1909.

Fortsetzung auf S. 99

Adrenalinversuche.

Versuch 10: Männliches Kaninchen, 1750 g; um $1^h 45'$ 21 ccm einer 10proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von $2^h 15'$ bis $2^h 25'$ wird eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, der Gallenblasengang an seinem Gallenblasenende abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die Galle wird ab $2^h 30'$ gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm		Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
$2^h 30'$—$2^h 35'$	1,2									
$2^h 35'$—$2^h 40'$	1,3	3,7								
$2^h 40'$—$2^h 45'$	1,2									
$2^h 30'$—$2^h 45'$		3,7	627,5	1011,0	2,14	0,0792	0,0792	102,1	0	
$2^h 45'$—$2^h 50'$	1,25									
$2^h 50'$—$2^h 55'$	1,45	4,0								
$2^h 55'$—3^h	1,3									
3^h —$3^h 5'$	0,9									Um 3^h werden 3,5 ccm Adren. hydrochl. puriss. Heisler 1 : 1000 subcutan injiziert.
$3^h 5'$ —$3^h 10'$	0,3	1,5								
$3^h 10'$—$3^h 15'$	0,3									
$2^h 45'$—$3^h 15'$		5,5	629,0	1011,0	2,08	0,1144	0,0572	105,7	0	
$3^h 15'$—$3^h 20'$	0,2									
$3^h 20'$—$3^h 25'$	0,2	0,6								
$3^h 25'$—$3^h 30'$	0,2									
$3^h 30'$—$3^h 35'$	0,5									
$3^h 35'$—$3^h 40'$	0,3	1,0								
$3^h 40'$—$3^h 45'$	0,2									
$3^h 45'$—$3^h 50'$	0,3									
$3^h 50'$—$3^h 55'$	0,4	1,0								
$3^h 55'$—4^h	0,3									
4^h —$4^h 5'$	0,35									
$4^h 5'$ —$4^h 10'$	0,35	1,0								
$4^h 10'$—$4^h 15'$	0,3									
$3^h 15'$—$4^h 15'$		3,6	622,6	1012,1	2,57	0,1025	0,0256	104,6	Spur	
$4^h 15'$—$4^h 20'$	0,2									
$4^h 20'$—$4^h 25'$	0,3	0,9								
$4^h 25'$—$4^h 30'$	0,4									
$4^h 30'$—$4^h 35'$	0,3									
$4^h 35'$—$4^h 40'$	0,3	0,9								
$4^h 40'$—$4^h 45'$	0,3									
$4^h 45'$—$4^h 50'$	0,35									
$4^h 50'$—$4^h 55'$	0,35	1,1								
$4^h 55'$—5^h	0,4									
5^h —$5^h 5'$	0,3									
$5^h 5'$ —$5^h 10'$	0,25	0,8								
$5^h 10'$—$5^h 15'$	0,25									
$4^h 15'$—$5^h 15'$		3,7	619,1	1013,2	2,88	0,1066	0,0266	112,5	+	
$5^h 15'$—$5^h 30'$		0,9								
$5^h 30'$—$5^h 45'$		0,8								
$5^h 45'$—6^h		0,8								

Tabelle zu Versuch 10 (Fortsetzung).

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
6^h —6^h 15′	0,6								
6^h 15′—6^h 30′	0,7								
5^h 15′—6^h 30′	3,8	621,4	1012,4	2,55	0,0969	0,0194	110,0	+	
6^h 30′—6^h 45′	0,4								
6^h 45′—7^h	0,5								
7^h —7^h 15′	0,6								
7^h 15′—7^h 30′	0,7								
7^h 30′—7^h 45′	0,5								
7^h 45′—8^h	0,5								
8^h —8^h 15′	0,4								
6^h 30′—8^h 15′	3,6	629,1	1012,2	2,44	0,0878	0,0125	103,3	0	

Versuch 11: Weibliches Kaninchen, 1650 g; um 3^h 10′ 20 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 3^h 40′ bis 4^h 10′: Ingularvenenkanüle, Abklemmung des Gallenblasenganges, Choledochusfistel, künstliche Atmung; die Galle wird von 4^h 10′ an gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Viscosität	Reduktion	Bemerkungen
4^h 15′—4^h 30′	2,1								Um 4^h 30′ werden 2,5 ccm Adrenal. hydrochl. puriss. Heisler 1 : 1000 subkut. injiziert.
4^h 30′—4^h 45′	0,9								
4^h 15′—4^h 45′	3,0	628,5	1009,8	2,02	0,0606	0,0303	105,2	0	
4^h 45′—5^h	1,0								
5^h —5^h 15′	1,1								
5^h 15′—5^h 30′	1,0								
5^h 30′—5^h 45′	1,0								
4^h 45′—5^h 45′	4,1	625,6	1010,4	2,27	0,0931	0,0233	104,3	+ gering	
5^h 45′—6^h	0,6								
6^h —6^h 15′	0,7								
6^h 15′—6^h 30′	0,7								
6^h 30′—6^h 45′	0,9								
6^h 45′—7^h	1,0								
5^h 45′—7^h	3,9	625,7	1010,8	2,15	0,0838	0,0168	109,7	+ stark	
7^h —7^h 15′	0,9								
7^h 15′—7^h 30′	0,8								
7^h 30′—7^h 45′	0,7								
7^h 45′—8^h	0,7								
7^h —8^h	3,1	618,0	1010,5	2,19	0,0679	0,0170	104,5	+	

Versuch 12: Weibliches Kaninchen, 2300 g, erhält um 2h 15′ 28 ccm einer 10proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 3h bis 3h 25′: Jugularvenenkanüle, Abklemmung des Gallenblasenganges, Choledochusfistel, künstliche Atmung; die Galle wird von 4h an gesammelt.

Zeit	Gallenmenge in ccm	Oberflächenspannung	Spezif. Gewicht	Trockenrückstand in %	Trockenrückstand in g	Trockenrückstand in g für 15 Minuten berechnet	Reduktion	Bemerkungen
4h —4h 15′	1,8							
4h 15′—4h 30′	1,7							
4h —4h 30′	3,5	611,2	1010,8	2,41	0,0844	0,0422	0	Von 4h 30′ bis 5h 49′ werden in 10 Dosen 10 ccm einer Lösung 1:10000 Adrenal. hydrochl. puriss. Heisler in die Jugularvene injiziert.
4h 30′—4h 45′	0,8							
4h 45′—5h	0,7							
5h —5h 15′	0,7							
5h 15′—5h 30′	0,7							
4h 30′—5h 30′	2,9	614,5	1011,1	2,36	0,0684	0,0171	+ gering	
5h 30′—5h 45′	0,6							
5h 45′—6h	0,6							
6h —6h 15′	0,8							
6h 15′—6h 30′	0,7							
6h 30′—6h 45′	0,7							
5h 30′—6h 45′	3,4	610,6	1012,7	2,87	0,0976	0,0195	+ gering	
6h 45′—7h	0,4							
7h —7h 15′	0,4							
7h 15′—7h 30′	0,4							
7h 30′—7h 45′	0,35							
7h 45′—8h	0,35							
8h —8h 15′	0,2							
6h 45′—8h 15′	2,1	606,7	1012,1	2,98	0,0626	0,0104	+ gering	

und Fermenten sehr reichen Pankreassaft. Hinsichtlich der Wirkung auf die Gallensekretion besteht eine Angabe von Langley[1]), daß das Adrenalin die Gallenmenge steigert. In 10 Versuchen habe ich Adrenalin subcutan oder intravenös gegeben.

Es ergibt sich also, daß unter Adrenalinwirkung

1. die Gallenmenge meist deutlich stärker sinkt als im Normalversuch. Nach subcutaner Injektion ist das Sinken der Gallenmenge nicht immer deutlich. Bei größeren Dosen und bei intravenöser Anwendung ist es meist sehr ausgesprochen, ja es kommt geradezu zu vorübergehendem Stillstand der Gallensekretion, ebenso wie das Gläßner und Pick[2]) für die Pankreas-

[1]) Zitiert nach Biedl, Innere Sekretion I, 487. 2. Aufl. 1913.
[2]) Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. 6, 313. 1909.

Versuch 13: Männliches Kaninchen, 2050 g, erhält um 2^h 5′ 26 ccm einer 10 proz. Urethanlösung mit der Schlundsonde. Von 2^h 45′ bis 3^h 10′ wird eine Kanüle in eine Jugularvene eingebunden, der Gallenblasengang an seinem Gallenblasenende abgeklemmt, eine Choledochusfistel angelegt und künstliche Atmung eingeleitet; die Galle wird von 3^h 25′ an gesammelt; von 5^h 4′ bis 5^h 34′ Tropfenzählung.

Zeit	Gallentropfen	Zeit	Gallentropfen	Zeit	Gallentropfen	Bemerkungen
5^h 3′ —5^h 4′	4	5^h 14′—5^h 15′	1	5^h 25′—5^h 26′	2	**Von 5^h 10′ bis 5^h 20′ laufen 5 ccm einer Lösung 1 : 10000 Adrenalin. hydrochlor. puriss. Heisler in die Jugularvene ein.**
5^h 4′ —5^h 5′	5	5^h 15′—5^h 16′	0	5^h 26′—5^h 27′	2	
5^h 5′ —5^h 6′	5	5^h 16′—5^h 17′	1	5^h 27′—5^h 28′	2	
5^h 6′ —5^h 7′	4	5^h 17′—5^h 18′	0	5^h 28′—5^h 29′	4	
5^h 7′ —5^h 8′	5	5^h 18′—5^h 19′	1	5^h 29′—5^h 30′	4	
5^h 8′ —5^h 9′	5	5^h 19′—5^h 20′	0	5^h 30′—5^h 31′	5	
5^h 9′ —5^h 10′	5	5^h 20′—5^h 21′	1	5^h 31′—5^h 32′	6	
5^h 10′—5^h 11′	7	5^h 21′—5^h 22′	2	5^h 32′—5^h 33′	3	
5^h 11′—5^h 12′	2	5^h 22′—5^h 23′	2	5^h 33′—5^h 34′	4	
5^h 12′—5^h 13′	1	5^h 23′—5^h 24′	1			
5^h 13′—5^h 14′	0	5^h 24′—5^h 25′	1			

sekretion gezeigt haben. Den gleichen Effekt auf die Gallensekretion hatte Naunyn[1]) beim Zuckerstich gesehen;

2. das spezifische Gewicht steigt.

3. Der prozentische Gallentrockenrückstand steigt, der absolute meist nicht.

4. Die Oberflächenspannung sinkt.

5. Die Viscosität ist oft stark erhöht.

6. In den Versuchen mit subcutaner Anwendung von Adrenalin fand sich stets Zucker in der Galle. Nach intravenöser Zufuhr sah ich nur einmal und auch da nur eine geringe Glykocholie. Der Anstieg des spezifischen Gewichtes, des relativen Trockenrückstandes ist nicht auf den Zuckergehalt der Galle allein zurückzuführen, da er sich auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, in den Versuchen mit intravenöser Adrenalininjektion ohne Glykocholie findet. Die Oberflächenspannung wird durch den Zuckergehalt der Galle nicht beeinflußt, wie Versuche mit Zusatz von wiederholt umkrystallisiertem Traubenzucker zur Galle zeigten; dagegen kann, wie aus den gleichen Versuchen hervorgeht, der Anstieg der Viscosität zum Teil eine Folge des Zuckergehaltes der Galle sein.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 3, 157.

Die Versuchsreihe ergab also abgesehen von den Normaldaten eine Beeinflussung derselben in folgendem Sinne:

Pilocarpin läßt die Gallenmenge unverändert oder erhöht sie um ein geringes; spezifisches Gewicht und Trockenrückstand sind gegenüber der Norm etwas erhöht, während die Oberflächenspannung keine Abweichung vom normalen Verhalten zeigt;

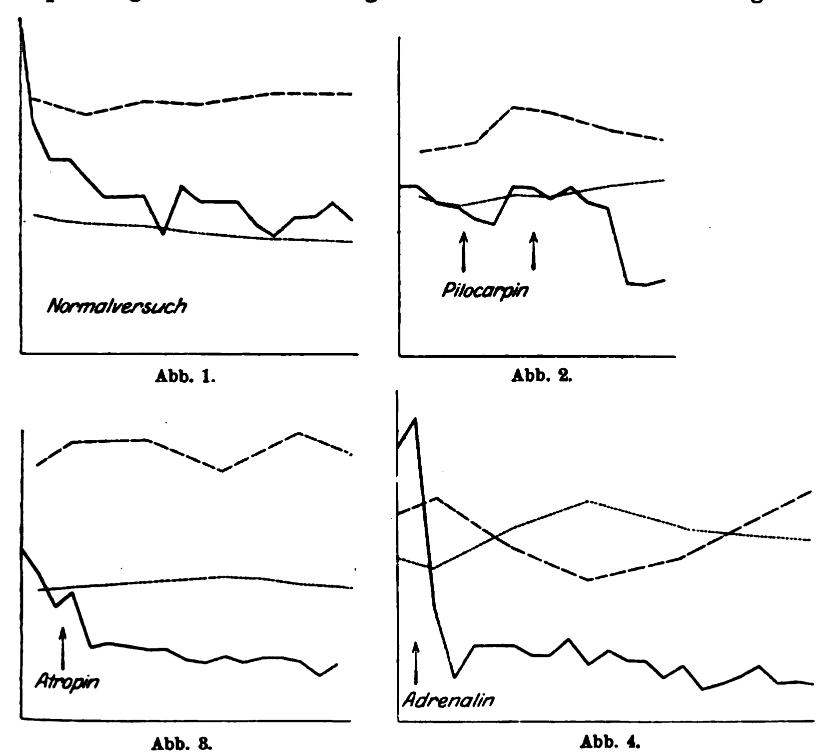


Abb. 1. Abb. 2.

Abb. 3. Abb. 4.

Die Kurven entsprechen den Versuchstabellen 4, 5, 9 und 10. Mit ununterbrochener Linie ist die Kurve der Gallenmenge, mit gestrichelter die der Oberflächenspannung, mit punktierter die des prozentischen Trockenrückstandes gezeichnet. Für die Kurve der Oberflächenspannung hat die Abszisse den Wert 600.

die Konzentrationszunahme der Galle dürfte daher auf jene Gallenbestandteile beschränkt sein, die keine hohe Oberflächenaktivität besitzen.

Atropin blieb in der verschiedensten Dosierung bei subcutaner und intravenöser Anwendung ohne deutliche Wirkung in irgendeiner Hinsicht auf Menge und Beschaffenheit der Galle.

Adrenalin verringert die Gallenmenge, erhöht ihr spezifisches Gewicht und ihren prozentischen Trockenrückstand, setzt

ihre Oberflächenspannung herab, dürfte also den Gehalt der Galle an oberflächenaktiven Stoffen, besonders an Gallensäuren erhöhen. Die Viscosität der Galle ist erhöht. Nach subcutaner Adrenalininjektion kommt es zu Glykocholie.

Die vorstehenden Kurven sollen diese Befunde illustrieren.

Es ergibt sich demnach im Versuch eine Verschiedenheit der durch pharmakodynamische Vagus- und Sympathicusreizung beeinflußten Gallensekretion, die, wenn auch geringgradig verglichen mit dem Verhalten der Speicheldrüsen, immerhin von prinzipieller Bedeutung erscheint.

Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan. I.

Über den Tryptophangehalt des Blutserums und der Milch.

Von

Otto Fürth und **Edmund Nobel.**

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes und aus der Klinik für Kinderkrankheiten der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 12. Juni 1920.)

I. Einleitung.

Bisherige Versuche zur Tryptophanbestimmung in Proteinen.

Zahlreiche im Verlaufe des letzten Dezenniums ausgeführte Untersuchungen, vor allem aber die wichtigen Arbeiten von Th. B. Osborne und L. B. Mendel, haben die große Bedeutung des Tryptophans für die Stoffwechsel- und Wachstumsvorgänge zur Genüge dargetan. Es hat sich immer wieder herausgestellt, daß Eiweißkörper, denen der cyclische Komplex des Tryptophans mangelt, wie das Zein aus Maiskörnern und wie die Gelatine, ungeeignet erscheinen, den Anforderungen des Organismus in bezug auf den normalen Ablauf der Wachstumsvorgänge zu genügen. Osborne hat seinerzeit die Vermutung ausgesprochen, daß die „Zyklopoiese", d. h. das Vermögen des Aufbaus gewisser cylcischer Komplexe eine Eigentümlichkeit der pflanzlichen Zelle sei, welche den tierischen Organismus in bezug auf gewisse Seiten des Ernährungsvorganges vom Pflanzenleben abhängig machen soll.

So erscheint denn heute die Ermittlung des Tryptophangehaltes tierischer und pflanzlicher Gewebe und Gewebsflüssigkeiten sowie der Nährstoffe als eines der dringendsten Postulate der Stoffwechselforschung.

Die Erkenntnis der Unzulänglichkeit der bisher für die Tryptophanbestimmung angegebenen Methoden hat uns dazu geführt, nach neuen Wegen Umschau zu halten. Schließlich hat

sich uns nach mannigfachen Vorversuchen ein colorimetrisches Verfahren als gangbar erwiesen, welches auf einer von Voisenet[1]) angegebenen Farbenreaktion beruht, nämlich auf der Violettfärbung, welche eintritt, wenn man eine Eiweißsubstanz in wässeriger Lösung oder Suspension mit sehr schwach nitrithaltiger konzentrierter Salzsäure in Gegenwart einer Spur von Formaldehyd versetzt.

Bevor wir jedoch auf diese Reaktion näher eingehen, dürfte es unerläßlich sein, die bisher für die quantitative Bestimmung des Tryptophans angegebenen Methoden, soweit dieselben zu unserer Kenntnis gelangt sind, und die mit Hilfe derselben gewonnenen Resultate zu überblicken.

a) Methode von Levene und Rouiller[2]): Verdauungsgemenge wurden nach Hopkins und Cole mit Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung ausgefällt. Nach Zerlegung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff und Beseitigung des letzteren wurde Amylalkohol, sodann unter lebhaftem Umschütteln Bromwasser hinzugefügt, bis die zunächst auftretende Purpurfärbung eben wieder verschwunden war. Die Menge des verbrauchten Bromwassers gibt ein relatives Maß für die Menge vorhandenen Tryptophans.

Die genannte Publikation enthält nur eine Andeutung des Prinzips, sowie zu berücksichtigender Fehlerquellen, jedoch keine Zahlenangaben über den Tryptophangehalt von Proteinen. Eine weitere Veröffentlichung über den Gegenstand scheint nicht erfolgt zu sein.

b) Methode von Fasal[3]). Dieselbe beruht auf der Glyoxylsäurereaktion des Tryptophans. Ein Dezigramm der Eiweißsubstanz in Pulverform wurde mit 2 ccm einer frischbereiteten Glyoxylsäurelösung und 6 ccm konz. H_2SO_4 versetzt. Die Farbenreaktion wurde mit Hilfe des Colorimeters von Dubosq mit einer Skala verschieden konzentrierter Tryptophanlösungen verglichen. Bei manchen Eiweißkörpern resultierte ein braunroter Farbenton, der einem genauen colorimetrischen Vergleiche hinderlich war. Die Resultate konnten durch Anwendung eines Farbenfilters aus Smaragdgrünlösung verbessert werden. Der so ermittelte Tryptophangehalt betrug für Epidermis 0,3—0,5%, Hornspäne 0,17%, Nägel, Schafwolle Spuren, Casein 0,65%, Lactalbumin 3,07%, Edestin 0,38%, Leber 1,0%, verschiedene Carcinome 1,6—1,7%, Sarkom der Ratte 1,4%.

---

[1]) E. Voisenet, Bull. Soc. Chim. Paris (3) **33**, 1198 1905. Chem. Centralbl. 1906 I, 90.

[2]) P. A. Levene und C. A. Rouiller (Rockefeller-Inst., New York), Journ. biol. Chem. **2**, 43. 1906.

[3]) H. Fasal (Labor. d. Spieglerstiftung, Wien), diese Zeitschr. **44**, 392. 1912. **55**, 88. 1913.

c) Methode von Herzfeld[1]). Dieselbe basiert auf der schönen Blaufärbung, welche (nach Rohde) Tryptophanlösungen mit p-Dimethylamidobenzaldehyd geben. Als Vergleichslösung wurde eine Standardlösung von Kupferoxydammoniak benützt, die einer bestimmten Tryptophankonzentration entsprach. Um den Tryptophangehalt eines Eiweißkörpers zu ermitteln, ging der Autor derart vor, daß er 1 g des getrockneten Eiweißkörpers in 0,5% Na_2CO_3 löste, $^1/_2$ g Pankreatin hinzufügte und (unter Zusatz von Chloroform und Xylol) 1 Tag im Brutofen der Verdauung überließ. Sodann wurde ein aliquoter Teil mit einer salzsauren Lösung des Reagens von bestimmter Zusammensetzung versetzt und nach 1tägigem Stehen die Intensität der Reaktion colorimetrisch bzw. spektrophotometrisch ausgewertet. Kontrollanalysen unter Zusatz von Tryptophan zu Eiweißlösungen fehlen. Es wird nur angegeben, daß einer 10fachen Tryptophankonzentration eine 10mal intensivere Farbenreaktion entspreche. Es fand sich so an Tryptophan in Blutalbumin 0,95%, Milchalbumin 0,91%, Fibrin 1,05%, Casein 0,51%, Elastin 0,22%, Hühnereiweiß 0,52%, Keratin 0,03%, Wittepepton 1,25%, Tyroalbumin 0,05%, Edestin 0,58%, Globulin aus Kürbiskernen 0,61%, Legumin 0,33%, Vitellin aus Kürbis 0,30% usw.

Die beschriebene Methode ist sodann von Elisabeth Kurchin[2]) zur Tryptophanbestimmung in normalen und pathologischen Nieren benutzt worden. Es wurde ein Mittelwert von etwa 0,06 g Tryptophan in einem Organe von ca. 300 g ermittelt. Casparis[3]) hat den Tryptophangehalt in normalen und pathologischen Lebern ermittelt.

d) Methode von Sanders und May[4]). Die Eiweißsubstanz wurde erst tryptisch verdaut und das Verdauungsgemisch der Fäulnis unterworfen; dabei geht das abgespaltene Tryptophan in Indol über. Dieses wurde mit einem Dampfstrom überdestilliert und schließlich mit Hilfe der Nitrosoindolreaktion colorimetrisch bestimmt. Im Casein wurde so als Minimalwert ein Gehalt von 1,6% Tryptophan ermittelt.

Von einem ähnlichen Gedankengange aus haben kürzlich E. und H. Salkowski die bei der Fäulnis von Proteinen aus dem Tryptophan entstehenden Abbauprodukte, nämlich Indol und Indolessigsäure bestimmt. Aus den erhaltenen Zahlen wird erschlossen, daß das Fibrin 2,21% Tryptophan enthalte.

e) Methode von Annie Homer[5]). Casein wurde mit gesättigtem Barytwasser am Wasserbade 20—120 Stunden hydrolisiert, das Baryum

---

[1]) E. Herzfeld (Chem. Labor. d. med. Klinik, Zürich), diese Zeitschr. **56**, 256. 1913.

[2]) E. Kurchin (Chem. Labor. der med. Klinik Zürich), diese Zeitschr. **65**, 451. 1914.

[3]) C. O. Casparis, Dissert. Zürich 1914.

[4]) J. A. Sanders und C. E. May (Indiana University), Biochemical Bulletin **2**, 373. 1913.

[5]) A. Homer (Lister Inst. London und Departement of Biochemistry, Univ. of Torento), Journ. of biol. Chem. **22**, 369. 1915.

mit Schwefelsäure beseitigt, das Filtrat mit Schwefelsäure auf 5% versetzt, mit Mercurisulfat in 5proz. Schwefelsäure ausgefällt, der Niederschlag mit 5% H_2SO_4 tyrosinfrei gewaschen, sodann in 2% H_2SO_4 suspendiert und mit H_2S zerlegt. Aus der so gewonnenen tryptophanhaltigen Zersetzungsflüssigkeit wurden die Polypeptide durch Fällung mit Phosphorwolframsäure beseitigt, diese mit Ätzbaryt, der Barytüberschuß mit Schwefelsäure entfernt. In einem aliquoten Teile des Filtrates wurde nunmehr das Bromadditionsvermögen ausgewertet und mit dem Bromadditionsvermögen einer Standard-Tryptophanlösung verglichen. Es ergab sich so in 6 Versuchen für das Casein ein Tryptophangehalt von 0,99—1,24%, nur in einem Falle ein solcher von 1,59%, welcher letztere mit der von Hopkins und Cole aus Hammarstenschem Casein erhaltenen Maximalausbeute von 1,5% Tryptophan übereinstimmt.

Indem wir uns vorbehalten, bei späterer Gelegenheit noch auf die einzelnen Methoden und die mit Hilfe derselben erzielten Resultate näher einzugehen, wenden wir uns nunmehr der Voisenetschen Reaktion zu.

II. Die Reaktion von Voisenet.

Voisenet hat seine Reaktion in der Weise angestellt, daß er z. B. 2—3 ccm einer Eiweißlösung in einem Reagensrohre mit einem Tropfen einer 5proz. Formollösung versetzte und sodann das dreifache Volumen einer sehr schwach nitrithaltigen konzentrierten Salzsäure[1]) hinzufügte. Dabei trat eine schöne Violettfärbung ein. Es ließ sich so in einer Eiweißlösung (z. B. in Milch) noch ein Formaldehydgehalt 1 : 10 000 000, sowie eine minimale Spur von salpetriger Säure erkennen. Für eine gegebene Eiweißmenge nahm die Färbung zunächst mit wachsendem Formaldehydgehalte zu. Sie wurde durch einen Überschuß sowohl von Formaldehyd als von salpetriger Säure zerstört. Der genannte Autor hat die Reaktion zum Nachweis von Formaldehyd sowie von salpetriger Säure in Nahrungsmitteln, insbesondere der Milch, zum Nachweise von Eiweißspuren im Harne und zu ähnlichen Zwecken empfohlen. Die meisten der untersuchten Eiweißkörper gaben die Reaktion. Bei der Gelatine, dem Keratin sowie beim „reinen Pepton" wurde sie jedoch vermißt.

Die Reaktion ist von Voisenet insofern richtig gedeutet worden, als er sie mit dem Indolkomplexe des Eiweißmole-

---

[1]) Konz. HCl, die pro Liter $^1/_2$—$^1/_4$ ccm 3,6proz. KNO_2-Lösung enthielt.

küles in Zusammenhang gebracht hat. „Cette réaction doit être attribué à la formation, en petite quantité, dans l'action des acides concentrés sur les matières albuminoides, des acides scatol-glycocollique, scatolcarbonique, indolcarbonique et des leurs produits de décomposition, scatol et indol: c'est la condensation avec la formaldehyde des produits d'oxydation de ces composés par l'acide azoteux, qui fournit la matière colorante révélatrice de cette réaction." Der Autor stellte auch fest, daß das Indol und Skatol befähigt sind, eine ähnliche Reaktion zu geben; von dem (bereits 1901 von Hopkins und Cole entdeckten) Tryptophan macht er keine Erwähnung.

Dagegen ist die Reaktion von anderer Seite als Tryptophanreaktion erkannt worden. So führt F. N. Schulz[1]) in seinem vortrefflichen Artikel über die Eiweißkörper des Harnes unter den Farbenreaktionen des Tryptophankomplexes im Eiweiß (neben der Reaktion von Adamkiewicz, derjenigen von Liebermann und neben den Reaktionen aromatischer Aldehyde) auch die Reaktion von Voisenet[2]) an.

Als wir nun bei der Suche nach einer Farbenreaktion, auf die eine verläßliche colorimetrische Bestimmung des Tryptophans basiert werden könnte, auf die Voisenetsche Reaktion gestoßen waren, erschien dieselbe allerdings bei flüchtiger Erprobung zunächst als launenhaft und für unsere Zwecke wenig aussichtsreich.

Bei näherer Durcharbeitung und bei systematischer Abänderung der Versuchsbedingungen sahen wir uns jedoch ver-

[1]) F. N. Schulz in der „Analyse des Harnes" (11. Aufl. von Neubauer-Hupperts Lehrbuch), II. Hälfte, S. 1089. 1913.

[2]) Aus Beobachtungen von O. Rosenheim, Biochem. Journ. **1**, 233 1906. S. F. Acree [(Amer. chem. Journ. **37**, 604. 1907, sowie aus späteren Beobachtungen von E. Voisenet (Compt. rend. de l'Acad. **166**, 709. 1918)] scheint die nahe Verwandtschaft der Voisenetschen Reaktion mit den Reaktionen von Adamkiewicz und von Hopkins und Cole zur Genüge hervorzugehen. — O. Rosenheim präzisiert diesen Zusammenhang in aller Schärfe (l. c. S. 239): „Formaldehyde gives rise to a characteristic colour reaction with proteids in the presence of sulfuric acid containing oxidising agents... The reaction is due to the formation of a proteid-formaldehyd-compound and its subsequent oxidation. The reaction depends on the presence of the Tryptophane (Indole) group in the proteid-molecule. The colour obtained is identical spectroscopically with that produced in the Adamkiewicz reaction and in Hopkins and Coles glyoxalic acid reaction."

anlaßt, dieser Reaktion gegenüber den anderen für uns in Betracht kommenden Farbenreaktionen ganz entschieden den Vorzug zu geben und wir haben es schließlich erlernt, störende Faktoren zu vermeiden und der Launenhaftigkeit der Reaktion Herr zu werden.

Die sehr zahlreichen in dieser Richtung ausgeführten methodischen Versuche sollen erst in der nachfolgenden Abhandlung (O. Fürth und F. Lieben) angeführt werden, um das von uns geübte Verfahren experimentell zu begründen. Hier mögen nur einige Andeutungen Platz finden.

Wir haben uns zunächst von der Spezifität der Reaktion überzeugt, insofern außer dem Tryptophan[1]) keiner der uns bekannten Komplexe des Eiweißmoleküls dieselbe gab. Die Reaktion wird bei jenen Eiweißkörpern vermißt, welche, wie die Gelatine und das Fibroin, kein Tryptophan enthalten. Gleichzeitig mit dem Verschwinden des Tryptophans (z. B. bei eingreifender Säurehydrolyse) verschwindet auch die Reaktion.

Die Reaktion verläuft nur dann glatt, wenn ganz bestimmte, ziemlich eng umgrenzte Versuchsbedingungen eingehalten werden. Sowohl ein Zuviel als auch ein Zuwenig von Formaldehyd, sowie von Nitrit vermag die Reaktion zu stören, ebenso die Anwesenheit von Oxydations- und Reduktionsmitteln. Unter den in hohem Maße störenden Faktoren haben wir nicht nur die gewöhnlichen organischen Lösungsmittel, sondern auch, als besonders bedeutungsvollen Faktor, das destillierte Wasser kennengelernt. Nur wenn die Menge desselben innerhalb des Reaktionsgemenges eine gewisse Grenze nicht überschreitet, kann mit einem glatten Verlaufe der Reaktion gerechnet werden. Im Zusammenhange mit diesem Umstande erscheint die Konzentration der zur Anwendung gelangenden Salzsäure wesentlich und ist die Intensität der Farbenreaktion merklich erhöht, wenn ceteris paribus statt der gewöhnlichen konzentrierten Salzsäure eine solche zur Verwendung gelangt, die vorher mit gasförmiger Salzsäure gesättigt worden ist.

Die Reaktion kommt dem im Verbande des Eiweißmoleküls

[1]) Ob das Oxytryptophan die Reaktion gibt, vermögen wir nicht zu sagen, da uns diese Substanz nicht in reinem Zustand zur Verfügung stand.

gebundenen Tryptophan in gleichem Maße zu, wie dem freien Tryptophan. Kontrollversuche lehrten, daß ein Plus von Tryptophan, das der Lösung eines Eiweißkörpers zugesetzt worden war, innerhalb der der Methode anhaftenden Fehlergrenzen wiedergefunden werden kann.

Die Reaktion ist nicht unbegrenzt haltbar. Wird dieselbe mit reiner Tryptophanlösung angestellt, so sieht man meist nach einiger Zeit eine Verfärbung der schönvioletten Flüssigkeit, eine Trübung und schließlich die Abscheidung eines dunkelgefärbten, schwerlöslichen Niederschlages. Von den Beziehungen einer derartigen Niederschlagsbildung zu der Liebermannschen Eiweißreaktion und zu den bei der Eiweißhydrolyse auftretenden Melanoidinen soll in einer späteren Abhandlung die Rede sein. Weit haltbarer als die Reaktion mit reiner Tryptophanlösung ist eine solche mit der Lösung einer tryptophanhaltigen Eiweißsubstanz. Eine derartige Reaktion kann ihre reine Farbe unter Umständen tagelang unverändert beibehalten, da das kolloidale Medium der spontanen Ausflockung des Farbstoffes entgegenwirkt. Wird eine solche Reaktionsflüssigkeit am Wasserbade erwärmt, derart, daß sich unter Einwirkung der darin enthaltenen konzentrierten Salzsäure eine Hydrolyse vollzieht, so sieht man alsbald eine Verfärbung und den Übergang des Farbstoffes in ein dunkelgefärbtes, sich in schwerlöslicher Form abscheidendes Produkt sich vollziehen.

Der Farbenton der Reaktion ist, je nach den Versuchsbedingungen, ein ziemlich variabler, insofern alle Zwischentöne zwischen Rotviolett mit entschiedenem Vorherrschen des Rot und reinem Blau in Erscheinung treten können. Die sich daraus ergebende Schwierigkeit einer colorimetrischen Auswertung kann durch Anwendung eines Blauglasfilters wenigstens in den meisten Fällen behoben werden.

Indem wir alle weiteren technischen und methodischen Einzelheiten einer späteren Abhandlung vorbehalten, begnügen wir uns hier, jenen Vorgang anzugeben, der sich uns schließlich als bei der Anstellung der Reaktion zweckmäßig ergeben hat.

Vorgang bei der Ausführung colorimetrischer Versuche. Als Standardlösung diente uns eine 0,1 proz. Lösung

von reinem Tryptophan[1]) (Merck) in 2proz. Natriumfluoridlösung.

Eine derartige Lösung erwies sich zwar nicht als absolut, aber immerhin längere Zeit hindurch haltbar, während Lösungen von Tryptophan in verdünnter Natronlauge und Salzsäure zuweilen schon nach kurzer Zeit die Invasion von Mikroorganismen und eine Abnahme des colorimetrischen Titers erkennen ließen. Die Anwendung von Standardlösungen von Tryptophan in reiner konzentrierter Salzsäure erwies sich als untunlich, da sich derartige Lösungen bei längerem Stehen unter Dunkelfärbung zersetzen.

Zur Anstellung der Reaktion wurden nun von dieser Standardlösung 2 ccm in ein graduiertes, 25 ccm fassendes trockenes Reagensglas mit Hilfe einer Pipette eingemessen und mit einem Tropfen einer 2,5proz. Formaldehydlösung versetzt. Nach Umschütteln fügt man 15 ccm konzentrierter Salzsäure hinzu und mischt durch Umschütten in ein zweites Reagensglas. Sodann fügt man 10 Tropfen einer 0,05proz. Natriumnitritlösung hinzu[2]), füllt mit konzentrierter Salzsäure auf 20 ccm auf, mischt wieder durch Umleeren und wartet nun einige Zeit, bis die nunmehr eintretende Farbenreaktion maximal geworden ist.

Wir gingen anfangs derart vor, daß wir den Nitritzusatz sogleich auf den Salzsäurezusatz folgen ließen und nun etwa $^1/_2$ Stunde lang den Eintritt des Maximums der Färbung abwarteten. Spätere Versuche haben uns aber darüber belehrt, daß es zweckmäßiger ist, die mit Formaldehyd und Salzsäure versetzte Reaktionsflüssigkeit nach gutem Durchmischen 5 bis 10 Minuten sich selbst zu überlassen; dabei kündigt sich der Ablauf der ersten Phase der Reaktion dem Auge durch Eintritt einer gelblichen Färbung an. Setzt man nunmehr Nitritlösung (am bequemsten aus einem Tropffläschchen) zu, so sieht man alsbald unter den zufließenden Nitrittropfen einen intensiv violett-

---

[1]) Das Präparat begann bei der Schmelzpunktbestimmung sich jenseits 220° bräunlich zu verfärben; beginnende Sinterung jenseits 250°; völlig geschmolzen bei 260° (Hopkins und Cole haben bei ihren Präparaten bei 220° Verfärbung, bei 252° völliges Schmelzen beobachtet). Eine Stickstoffbestimmung (Kjeldahl nach langdauerndem Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von Kaliumsulfat) ergab 13,16% N (statt 13,72%).

[2]) Es ist zu beachten, daß eine 0,05 proz. Nitritlösung nicht unbegrenzt haltbar ist. Es empfiehlt sich daher, eine 5proz. Natriumnitritlösung vorrätig zu halten, aus der das Reagens durch 100fache Verdünnung bequem frisch bereitet werden kann.



roten Farbenring auftreten. Mischt man nunmehr durch, so nimmt die ganze Flüssigkeit eine schöne violette Färbung an.

Dieselbe gleicht in ihrer Intensität annähernd einer 0,01 proz. alkoholisch-wässerigen Gentianaviolettlösung, welcher allerdings ein mehr rötlicher Farbenton eigentümlich ist. Immerhin kann eine derartige Gentianaviolettlösung die 0,1% Tryptophan-Standardlösung zur Not ersetzen, wenngleich wir der letzteren unter allen Umständen um so mehr den Vorzug gegeben haben, als die Erfahrung gelehrt hat, daß die (selbstverständlicherweise unvermeidlichen) Schwankungen der colorimetrischen Standardfärbung sich bei genügender Übung und Sorgfalt auf ziemlich enge Grenzen reduzieren lassen.

Um nun den Tryptophangehalt einer Flüssigkeit (es möge sich nun um freies oder in Protein gebundenes Tryptophan handeln) zu ermitteln, wird parallel mit der Anstellung der Standardreaktion aus einer 0,1 proz. Tryptophanlösung, in ganz analoger Weise die Reaktion mit 2 ccm der zu prüfenden Lösung ausgeführt.

Dabei ist aber ein sehr wesentlicher Umstand wohl zu beachten: die Menge von 10 Tropfen 0,05 proz. Natriumnitritlösung auf 2 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit entspricht eben dem Optimum für eine 0,1 proz. Tryptophanlösung bzw. für eine Eiweißlösung von entsprechendem Tryptophangehalt. Ein Minus von Tryptophan aber erfordert weniger, ein Plus mehr Nitrit. Da man aber den Tryptophangehalt der zu prüfenden Lösung im allgemeinen ja nicht kennt, muß man vorsichtig tastend vorgehen und durch allmählichen tropfenweisen Zusatz der Nitritlösung das Optimum praktisch ermitteln. Es gelingt dies im allgemeinen ohne Schwierigkeiten. War das Optimum der Reaktion noch nicht erreicht, so sieht man, wenn man die mehr oder weniger intensiv violett gefärbte Flüssigkeit, ohne umzuschütteln, mit 2 Tropfen der Nitritlösung überschichtet, alsbald einen intensiver gefärbten Ring entstehen, der die Zunahme der Reaktion ausreichend verrät. Man mischt dann durch und fährt mit dem Nitritzusatz fort, bis die Färbung sich nicht mehr steigert, was auch sehr bequem durch eine Parallelprobe mit um 2 Tropfen gesteigertem Nitritzusatz kontrolliert werden kann. Eine Nichtbeachtung dieser Vorsichten kann zu ganz verfehlten Resultaten Anlaß geben. So kann es geschehen, daß eine konzentriertere Lösung eines sehr tryptophanreichen Eiweißkörpers bei Zusatz von 10 Tropfen der Nitritlösung überhaupt noch keine Violettfärbung gibt, die erst bei einem Mehrzusatz von Reagens mit großer Intensität eintritt.

Sobald nun in der Reaktionsflüssigkeit die optimale Reaktion nach Schätzung mit freiem Auge eingetreten ist, bringt man die Standardlösung einerseits, das zu bestimmende Reaktionsgemisch andererseits in die beiden Tröge des Dubosqcolorimeters.

Man darf dazu natürlich nicht die gewöhnlichen zum Apparate gehörigen mit einer Metallfassung versehenen Tröge verwenden, welche die Berührung mit Salzsäure nicht vertragen würden, abgesehen davon, daß die Anwesenheit selbst kleiner Mengen von Kupfer u. dgl. die Reaktion stört. Wir haben uns vielmehr zu diesem Zwecke besondere (mit säurefestem Kitt gekittete) Tröge anfertigen lassen, bei denen die zu colorimetrierende Flüssigkeit ausschließlich mit Glas in Berührung kommt.

Zur Bestimmung stellt man den Standard auf eine Schichtendicke von 10 mm, oder aber, wenn es sich um geringe Farbenintensitäten handelt, auf 5 mm ein und nimmt die Bestimmung in üblicher Weise vor. Entspricht der Farbenton der zu bestimmenden Lösung annähernd dem Farbentone der Standardlösung, so wird man ohne Blauglas einstellen. Sehr häufig (z. B. bei Lösungen von Organeiweißkörpern oder Verdauungsgemischen) nimmt die Probe einen mehr rötlichen Ton an, der die Anwendung des Blauglases erfordert.

Man unterlasse es beim Arbeiten mit dem Dubosqcolorimeter niemals, nachdem man eine Bestimmung ausgeführt und das Mittel aus mehreren Ablesungen registriert hat, die beiden Tröge (rechts und links) zu vertauschen und die Ablesungen zu wiederholen. Man ziehe das Mittel aus einer gleichen Zahl von Ablesungen, wobei die Standardlösung rechts und solcher, wobei sie links zu stehen kam. Nur so kann man aus Ungleichmäßigkeiten der Beleuchtung und des optischen Apparates sich ergebende Fehler ausreichend einschränken. Auch soll man nach Beendigung der Bestimmung es nie unterlassen, in den Trog mit der zu prüfenden Flüssigkeit einige Tropfen 0,05 proz. Nitritlösung zufließen zu lassen, mit einem Glasstäbchen umzurühren und die Bestimmung zu wiederholen, um festzustellen, ob die Reaktion wirklich bereits die maximale sei.

Noch eines ist zu bemerken. Der beim Ansetzen der Reaktion mit eiweißhaltigen Flüssigkeiten auftretende Eiweißniederschlag löst sich meist in der konzentrierten Salzsäure leicht und vollständig. Dagegen bildet sich überall dort, wo die Flüssigkeit reich an anorganischen Salzen ist, bei Zusatz von konzentrierter Salzsäure eine Fällung. (Es war dies z. B. stets der Fall, wenn wir Lösungen von Eiweißkörpern in starker Lauge zur Untersuchung brachten.) Eine solche Fällung muß vor dem Colorimetrieren durch Filtration mit Hilfe eines gehärteten Filters (Schleicher und Schüll) beseitigt werden. Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß selbst geringfügige Trübungen die Resultate der Colorimetrie in weitgehendem Maße zu fälschen geeignet sind.

Der Tryptophangehalt der zu colorimetrierenden Flüssigkeit wird am besten 0,05—0,20% betragen und man wird gut

tun, durch Einengen oder Verdünnen nach Möglichkeit diesen Konzentrationsbereich anzustreben, falls man auf einen höheren Grad von Genauigkeit Wert legt.

III. Trytophangehalt des Blutserums.

Wir sind nunmehr daran gegangen, den Tryptophangehalt des Blutserums und der darin enthaltenen Eiweißkörper mit möglichster Sorgfalt zu ermitteln und teilen die einschlägigen Versuche im folgenden mit:

a) Pferdeserum. Voisenet ergab
0,27% Tryptophan
0,28% „

Kjeldahl: 3 ccm Serum $\left.\begin{matrix}0{,}0340\\0{,}0340\end{matrix}\right\}$ g N. Serum enthält 1,133% N, was 7,13% Serumeiweiß (mit einem Gehalte von 15,9% N berechnet) entspricht. Demnach enthält das Serumeiweiß 3,93% Tryptophan.

b) Globulin des Pferdeserums. Pferdeserum wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gelöst, die Lösung mit Magnesiumsulfat in Substanz gesättigt, der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und wieder in Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung enthielt in 3 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0472\\0{,}0468\end{matrix}\right\}$ 0,0470 g N, demnach 0,94% N, oder 5,8% Globulin (mit 16% N berechnet). Die Colorimetrie ergab für diese Lösung 0,24% Tryptophan. Demnach enthielt das Globulin 4,14% Tryptophan.

c) Albuminfraktion des Pferdeserums. Pferdeserum wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung ausgefällt, filtriert und das Filtrat mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, die Lösung unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure auskoaguliert. Das Koagulum wurde sulfatfrei gewaschen, feucht mit 30 proz. Natronlauge verrieben und durch $^1/_4$ stündiges Erwärmen am Wasserbade in Lösung gebracht. Die so erhaltene Lösung ergab colorimetrisch einen Tryptophangehalt von 0,021%. Kjeldahl ergab in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0108\\0{,}0108\end{matrix}\right\}$ g N, demnach 0,216% N. Daraus ergab sich ein Gehalt von 1,36 Serumalbumin (mit 15,9% N berechnet). Demnach enthielt Serumalbumin 1,54% Tryptophan.

d) Rinderblutserum. Rinderblutserum wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung ausgefällt, der Globulinniederschlag mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen, im Wasser gelöst, die Lösung am Wasserbade auskoaguliert und das Koagulum sulfatfrei gewaschen; sodann durch Erwärmen mit 30 proz. Kalilauge in Lösung gebracht. Die Lösung ergab colorimetrisch einen Gehalt von 0,26% Tryptophan. Kjeldahl gab in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0393\\0{,}0391\end{matrix}\right\}$ 0,0392 g N, also 0,788% N; dies

entspricht 4,93% Globulin, demnach enthielt das Globulin 5,27% Tryptophan.

Das Filtrat der Globulinfällung wurde mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt, der Albuminniederschlag in Wasser gelöst, die Lösung auskoaguliert, das Koagulum abfiltriert, sulfatfrei gewaschen, in 30 proz. Kalilauge unter Erwärmen gelöst. Die Lösung ergab colorimetrisch einen Gehalt von 0,12% Tryptophan. Kjeldahl in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0,0384\\0,0378\end{matrix}\right\}$ 0,0381 g N, demnach 0,762% N, was 4,76% Eiweiß entspricht. Demnach enthielt diese Albuminfraktion 2,52% Tryptophan.

e) Krystallisiertes Albumin aus Pferdeserum. Ein Pferdeserum ergab colorimetrisch 0,184% Tryptophan. Ein Parallelversuch mit Oxalatplasma ergab 0,205% Tryptophan.

$^1/_2$ l des frischen Pferdeserums wurde mit 125 ccm $^n/_{10}$ HCl versetzt. Eine abgemessene Menge davon mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, filtriert, das Filtrat sodann mit $^n/_5$ H_2SO_4 bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das Gemenge blieb einen Tag im Brutofen stehen und wurde sodann in die Kälte gestellt. Es erfolgte eine reichliche, durchaus krystallinische Abscheidung, aus winzigen Nädelchen neben größeren „Bergkrystallformen“ bestehend. Diese wurden abfiltriert, in Wasser gelöst, die Lösung auskoaguliert, sulfatfrei gewaschen; auf Zusatz von 30 proz. KOH erfolgt beim Erwärmen innerhalb weniger Minuten vollständige klare Lösung. Die Colorimetrie ergab 0,02% Tryptophan; Kjeldahl in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0,0122\\0,0122\end{matrix}\right\}$ g N, demnach 0,24% N, entsprechend 1,5% Eiweiß. Für das krystallisierte Serumalbumin ergibt sich sonach ein Gehalt von 1,3% Tryptophan.

f) Albumin und Globulin aus Pferdeserum. 200 ccm Serum wurden mit Magnesiumsulfat in Substanz gesättigt. Das albuminhaltige Filtrat ergab bei direkter Colorimetrie 0,035% Tryptophan und enthielt 2,56% Eiweiß, woraus sich für das Albumin ein Tryptophangehalt von 1,36% berechnen ließ. Nunmehr wurde die albuminhaltige Lösung auskoaguliert, das Koagulum sulfatfrei gewaschen und ein Teil desselben in 30 proz. Kalilauge gelöst. Es resultierte so eine Lösung mit einem Eiweißgehalt von 2,06% und einem colorimetrischen Voisenet-Titer von 0,024% Tryptophan. Daraus würde sich für das Albumin ein Tryptophangehalt von 1,17% ergeben.

Der abfiltrierte (durch $MgSO_4$-Fällung) gewonnene Globulinniederschlag wurde in ganz analoger Weise weiterbehandelt. Es resultierte schließlich eine Lösung mit einem Gehalte von 1,72% Eiweiß und 0,081% Tryptophan, woraus sich für das Globulin ein Tryptophangehalt von 4,71% berechnen ließ.

Pferdebluteerum enthält nach Hammarsten (Lehrbuch, 8. Aufl., S. 307) auf 551 Teile Flüssigkeit 42 Teile Eiweiß, i. e. 7,6%. Unter der Annahme, daß im Serum die Albumin- und Globulinfraktion ungefähr zu gleichen Teilen vorhanden wären, ergibt sich als mittlerer Tryptophangehalt der Serumeiweißkörper $\left.\begin{matrix}(4,7)\\(1,3)\end{matrix}\right\}$ 3,0 etwa 3%. Wenn also 7,6 % derartiges

Eiweiß im Serum vorhanden wäre, so würde für das Blutserum ein Tryptophangehalt von 0,23% resultieren. Tatsächlich ergab die direkte Colorimetrie bei diesem Serum einen Gehalt von 0,20% Tryptophan.

g) Dysenterieserum. Der Vergleich eines Dysenterie-Heilserums (Shiga - Kruse) mit einem normalen Pferdeserum ergab in ersterem Falle einen Tryptophangehalt von 0,56%, in letzterem einen solchen von 0,34%. Diesem Dysenterieserum war also ein auffallend hoher colorimetrischer Titer eigentümlich.

h) Pleuritisches Exsudat. (Diagnose: Apicitis; Pleuritis.) Opalescente gelbe Flüssigkeit; im Sedimente massenhaft rote Blutkörperchen und Leukocyten vorhanden.

Fällung durch Halbsättigung mit Ammonsulfat; Globulinfraktion in H_2O gelöst, opalescente Lösung am Wasserbade koaguliert, Koagulum mit heißem Wasser sulfatfrei gewaschen, durch $^1/_4$stündiges Erwärmen in 30proz. Kalilauge gelöst. Lösung enthielt 0,34% N entsprechend 2,15% Globulin. Colorimetrie: 0,10% Tryptophan. Demnach enthielt dieses Globulin 4,65% Tryptophan.

i) Globulinfraktion aus einem perikarditischen Exsudat (Mucoid). Opalescente gelbliche Flüssigkeit. Spärliches, aus Leukocyten und Lymphocyten bestehendes Sediment. Halbsättigung mit Ammonsulfat bewirkt reichlichen Niederschlag; wasserhelles, nahezu eiweißfreies Filtrat. Der abfiltrierte Niederschlag erweist sich in Wasser unlöslich; geht auf Zusatz von verdünnter Natronlauge in Lösung; bei Zusatz von Salzsäure erfolgt Fällung; diese wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Es erfolgt fast vollständige Lösung zu einer opalescenten Flüssigkeit. Dieselbe enthält 0,0658% N und 0,032% Tryptophan (da nach Hammarsten Mucoid aus Exsudaten 12,4—13,1%, Mittel 12,8% N enthält), was 0,52% Mucoid mit einem Tryptophangehalt von 6,1% entspricht.

Überblicken wir nunmehr die mitgeteilten Versuche, so ergibt sich etwa folgendes:

Das Blutserum enthält eine recht erhebliche Menge Tryptophan in Eiweißbindung. Die untersuchten normalen Pferdesera ergaben Werte von 0,20—0,34% Tryptophan.

Dasselbe verteilt sich nicht gleichmäßig auf die beiden hauptsächlichen Eiweißfraktionen. Es fand sich

Versuch	in der Albuminfraktion Tryptophan	in der Globulinfraktion Tryptophan
b) Pferdeserum		4,14%
c) „	1,54%	
d) Rinderblutserum	2,52%	5,27%
e) Pferdeserum	1,30%	
f) „	1,17%	4,71%
h) Pleuritisches Exsudat . .		4,65%
i) Perikarditisches Exsudat .		6,10%

Wir werden also nicht bezweifeln können, daß die globulinartigen Eiweißsubstanzen des Blutserums der Albuminfraktion gegenüber durch einen weit höheren Tryptophangehalt ausgezeichnet sind. Die, wie es scheint, nicht unerheblichen Schwankungen des Tryptophangehaltes des Blutserums, der Exsudate und der Transsudate sind also offenbar nicht allein durch den Eiweißgehalt als solchen, sondern auch durch das Verhältnis zwischen tryptophanarmen Albuminen und tryptophanreichen Globulinen bedingt.

Weitere Untersuchungen sollen darüber Aufschluß geben, inwieweit die colorimetrische Tryptophanbestimmung im Blutserum, sowie in pathologischen Exsudaten und Transsudaten klinisch-diagnostischen Zwecken dienstbar gemacht werden kann.

Wir bemerken noch, daß in der Literatur nur eine Angabe über „Blutalbumin" von Herzfeld (s. o.) mit 0,95% Tryptophan vorzuliegen scheint, wobei nicht ersichtlich ist, ob es sich dabei um die Albuminfraktion, oder um das gesamte Bluteiweiß gehandelt hat.

IV. Tryptophangehalt der Milch.

A. Casein.

Wir haben uns zunächst bemüht, den Tryptophangehalt des Caseins möglichst genau zu ermitteln:

a) Casein nach Hammarsten. 1 g Hammarstensches Casein in NaOH 30 proz. suspendiert und 2 Tage im Brutofen belassen. Die 1,64 proz. Lösung ergab colorimetrisch 0,027% Tryptophan. Das Caseinpräparat enthielt demnach 1,64% Tryptophan.

b) Casein nach Hammarsten. $^1/_2$ g Casein Hammarsten wurde ohne vorhergehende Trocknung in 20 ccm $^n/_{10}$-NaOH suspendiert und in den Brutofen gestellt. Nach kurzer Zeit erfolgte klare Lösung. Dieselbe enthielt in 5 ccm (Kjeldahl) $\left.\begin{matrix}0,0148\\0,0148\end{matrix}\right\}$ g N, in 100 ccm 0,297 g N, was (Casein nach Hammarsten mit 15,65% N angenommen) 1,90 g Casein entspricht. Die colorimetrische Bestimmung ergab 0,037% Tryptophan, woraus sich für das Casein ein Tryptophangehalt von 1,95% berechnet.

c) Käufliches Casein. $2^1/_2$ g käuflichen Caseins wurden in 100 ccm $^n/_{10}$-NaOH bei Brutofentemperatur in Lösung gebracht. Trübe Lösung. Kjeldahl 5 ccm $\left.\begin{matrix}0,01414\\0,01414\end{matrix}\right\}$ g N, 100 ccm : 0,283 g N, woraus sich ein 1,81 proz. Caseingehalt ergibt. Colorimetrie: 0,038% Tryptophan, woraus sich für das Casein ein Tryptophangehalt von 2,10% berechnet.

d) **Caseinfällung aus frischer Kuhmilch. Indirekte Bestimmung.** (Prot. Nr. XXII.) Das Casein wurde aus der verdünnten Milch nach Schloßmann durch Fällung mit Alaunlösung abgeschieden und die Menge desselben durch Kjeldahlbestimmung mit 2,06% ermittelt. Die colorimetrische Tryptophanbestimmung in der Milch ergab 0,070%, in der zugehörigen Molke dagegen (nach Spontangerinnung durch Filtration gewonnen) 0,025%. Sonach entfällt auf das Casein als solches ein Tryptophangehalt von 0,070 — 0,025 = 0,045%. Aus dem Caseingehalt der Milch (2,06%) ergibt sich für das Casein ein Tryptophangehalt von 2,18%.

e) **Caseinfällung nach Schloßmann.** $^1/_2$ l frische Kuhmilch mit Wasser auf 2 l verdünnt und mit 50 ccm gesättigter Kalialaunlösung gefällt. Das Koagulum wurde abfiltriert. 10 g des feuchten Koagulums wurden in Kalilauge in Lösung gebracht. Die Kjeldahlbestimmung in dieser Lösung ergab 0,548% N, was 3,51% Casein entspricht. Die Colorimetrie ergab $\left.\begin{matrix}0{,}078\\0{,}080\end{matrix}\right\}$ 0,079% Tryptophan, woraus man für das Casein einen Tryptophangehalt von 2,25% ableiten kann.

Die ausgeführten Bestimmungen haben sonach in guter Übereinstimmung für das Casein einen Tryptophangehalt von

a) 1,64%
b) 1,95%
c) 2,10%
d) 2,18%
e) 2,25%
im Mittel 2,02%

ergeben.

Vergleichen wir diesen Wert mit den vorliegenden Literaturangaben, so finden wir bei Fasal 0,65%, bei Herzfeld 0,51%, bei Sanders und May 1,60%. Annie Homer, deren Methodik im zweiten Teile der Arbeit kritisch erörtert werden soll, hat in einem Falle einen Wert von 1,95%, bei 6 weiteren Analysen 0,99—1,24% gefunden. Hopkins und Cole haben bei der Tryptophandarstellung aus Hammarstenschem Casein eine Maximalausbeute von 1,5% erhalten, was nach unseren Analysen drei Viertel der tatsächlich vorhandenen Tryptophanmenge entspricht und angesichts der erheblichen methodischen Schwierigkeiten als eine recht günstige Ausbeute bezeichnet werden muß.

B. Kuhmilch.

Der direkten colorimetrischen Ermittlung des Tryptophangehaltes der Milch stehen infolge der feinen Verteilung des Fettes in derselben sehr erhebliche und, wie aus dem folgenden hervor-

geht, noch nicht völlig überwundene Schwierigkeiten entgegen. Während, wie im zweiten Teile der Arbeit gezeigt werden wird, im Blutserum und in anderen tierischen Flüssigkeiten der Tryptophangehalt direkt innerhalb der der Methode anhaftenden Fehlergrenze ermittelt werden kann, erfordert die sichere Ermittlung des Tryptophangehaltes einer Milchprobe die Bestimmung der darin enthaltenen Caseinmenge und die Ermittlung des Tryptophangehaltes der Molke. Der Tryptophangehalt des Caseins kann (s. o.) mit rund 2% veranschlagt werden.

Wird mit einer Milchprobe in der früher beschriebenen Art die Voisenet-Reaktion angestellt, so geht das Eiweiß zwar in der konzentrierten Säure leicht und vollständig in Lösung, die Probe erscheint aber zunächst von dem suspendierten Fette so stark getrübt, daß an eine colorimetrische Auswertung des auftretenden Farbstoffes gar nicht gedacht werden kann. Läßt man nun die Probe etwa in Tropftrichter einen oder besser 2 Tage lang ruhig stehen, so sammelt sich das Fett an der Oberfläche an. Man kann nun die geklärte unterstehende Flüssigkeit aus dem Trichter ohne umzuschütteln ablassen und nunmehr immerhin colorimetrieren. Die letzten Reste der Trübung, die für das Auge kaum mehr auffällig sein mögen, zu beseitigen, wird aber nicht immer gelingen. Da nun aber jede Trübung die Colorimetrie weitgehend fälscht, wird es leicht geschehen, daß der colorimetrische Titer größer erscheint als der Wirklichkeit entspricht.

Wir haben die Analyse einer Anzahl von Milchproben durchgeführt und teilen die Ergebnisse in aller Kürze tabellarisch mit, wobei die vorerwähnte Fehlerquelle sich deutlich geltend macht.

Der Gesamteiweißgehalt unserer Milchproben liegt (abgesehen vom Versuche XXX, wo es sich offenbar um stark gewässerte Milch gehandelt hat) zwischen 2,4—2,8%. Da nun weitaus die Hauptmenge der Eiweißkörper der Kuhmilch auf die Caseinfraktion entfällt, diese aber etwa 2% Tryptophan enthält, wäre zu erwarten, daß der Tryptophangehalt der Gesamtmilch sich um 0,05—0,06% herum bewege. Nun haben wir aber in einem Teile unserer Proben wesentlich höhere Werte gefunden. Falls dieselben wirklich zutreffend wären, könnte dies nur so geschehen, daß entweder das koagulable Molkeneiweiß um sehr vieles tryptophanreicher wäre, als das Casein, oder aber so, daß überdies eine nicht unerhebliche Menge Tryptophan in der Molke in nichtkoagulabler Form vorhanden wäre.

Wir haben, um daraufhin zu untersuchen, bei einigen unserer Proben das Sauerwerden der Milch und die Spontanabscheidung des Caseins ab-

Laufende Nr. der Versuche	Tryptophangehalt, colorimetrisch ermittelt in %		Stickstoffgehalt d. Milch in %	Gehalt der Milch an		Berechn. Tryptophangehalt in %	
	in der gesamten Milch	in der Molke		Casein in %	Gesamteiweiß (unter Vernachlässigung des Rest-N berechnet)	d. Gesamteiweißkörper der Milch in %	der Eiweißkörper der Molke
X	0,058	0,013	0,43	—	2,80	2,04	—
	0,057						
XI ...	0,094	0,012	0,44	—	2,81	3,26	—
	0,091						
XVI ...	0,076	0,006	0,41	—	2,68	2,80	—
XXII ..	0,070	0,025	0,41	2,06	2,68	—	—
XXIX	0,103	—	0,43	2,32	2,80	3,67	—
XXX ..	0,050	—	0,29	—	1,85	2,70	6,62(?)
XXXV	—	—	0,38	2,30	2,37	—	1,92
							2,30
XXXVI	0,081	—	0,38	—	2,37	3,47	—
	0,082						
XXXVI	0,063	—	0,40	—	2,52	2,52	2,3
XXXVIII	0,075	—	0,42	—	2,60	2,9	—
XXI ...	0,050	—	0,44	—	2,81	1,9	—
XXII ..	0,076	—	0,34	—	2,92	2,85	1,79
			0,43	—	2,7		—

gewartet. Dann wurde die saure Molke abfiltriert und am Wasserbade koaguliert, das Koagulum abfiltriert, in ein wenig 30 proz. Natronlauge in der Wärme in Lösung gebracht und die Lösung sodann in bezug auf ihren Stickstoffgehalt und colorimetrischen Tryptophantiter untersucht. Daraus wurde dann der Gehalt des Molkeneiweißes an Tryptophan berechnet.

Die gefundenen Werte sind in der letzten Kolonne unserer Tabelle angeführt. Nur einer derselben (Versuch XXX, 6,62%) zeigt einen hohen Wert. Alle anderen liegen aber zwischen 1,8—2,3%, also wiederum um 2% herum. Nun wissen wir freilich, daß das Molkeneiweiß mindestens aus 2 Komponenten (Lactalbumin und Lactoglobulin) besteht und es wäre ja immerhin denkbar, daß etwa die Globulinkomponente durch einen hohen Tryptophangehalt ausgezeichnet sei und unter gewissen Bedingungen vermehrt in der Milch austreten könnte. Auch ist es auffallend, daß Fasal[1]) ein Lactalbumin (über dessen Darstellungsweise und Provenienz nichts Näheres angegeben wird) durch einen relativ hohen Tryptophangehalt von 3% ausgezeichnet fand, und dasselbe als den tryptophanreichsten Eiweißkörper bezeichnet.

Die Frage des Tryptophangehaltes der Molkeneiweißkörper bedarf also einer weiteren eingehenden Untersuchung.

[1]) l. c.

Die Durchführung derselben muß jedoch auf einen späteren Zeitpunkt verschoben werden, da dazu die Verarbeitung größerer Milchmengen erforderlich ist, als gegenwärtig hierzulande für Laboratoriumszwecke mit gutem Gewissen in Anspruch genommen werden können.

Nur in einem Falle war im klaren Filtrat der auskoagulierten Molkeneiweißkörper noch Tryptophan nachweisbar; es kann also, vermutlich unter der Einwirkung der Gärungsmikroorganismen, etwas Tryptophan in eine unkoagulable Form übergehen. Zwei weitere Versuche in dieser Richtung waren allerdings negativ. Also auch diese Frage bedarf noch der Klarstellung.

Es sei in diesem Zusammenhange darauf hingewiesen, daß nach neuen Untersuchungen von Osborne und Mendel[1]) das Lactalbumin dem Casein überlegen ist, und zwar sowohl in bezug auf die Förderung des Wachstums von Ratten als auch in bezug auf die Mindestmenge Eiweiß, die zur Erhaltung des Körpergewichtes notwendig ist. Beim Casein soll allerdings die schlechtere Wirkung mit dem geringeren Cystingehalte zusammenhängen. Es haben ferner neue Untersuchungen von Edelstein und Langstein[2]) auch für den Säugling ergeben, daß Lactalbumin und Casein nicht gleichwertig sind. „Nicht auf die mehr oder minder gute Verdaulichkeit der Milcheiweißkörper kommt es an, sondern auf die innere Qualität der Milchproteine. Das Lactalbumin ist vermöge seiner Zusammensetzung aus bestimmten Bausteinen für das Wachstum der Säuglinge günstiger als das Casein.“

C. Frauenmilch.

a) Colorimetrie (nach Spontanabrahmung des Fettes beim Stehen) ergibt 0,070% Tryptophan; Kjeldahl 0,302% N, was 1,92% Milcheiweiß (mit 15,7% N) unter Vernachlässigung des Rest-N berechnet, ergibt. Demnach enthält Milcheiweiß 3,64% Tryptophan.

b) Colorimetrie ergibt 0,094% Tryptophan für die Gesamtmilch. Nach der im Verlaufe einiger Tage vollzogenen Spontangerinnung wurde durch ein trockenes Filter filtriert. Im Milchserum fand sich nunmehr 0,023% Tryptophan.

[1]) Th. B. Osborne und L. B. Mendel, Journ. biol. Chem. 26, 1. 1917. Jahresber. üb. d. Fortschr. d. Tierchemie 47, 254. Chem. Centralblatt 1917 I, 592.

[2]) F. Edelstein und L. Langstein, Zeitschr. f. Kinderheilk. 20, 12. 1919.

c) Milchprobe (mit einem Fettgehalte von $2^1/_2$%) ergab colorimetrisch einen Gehalt von $\left.\begin{matrix}0{,}061\\0{,}066\end{matrix}\right\}$ Mittel 0,063% Tryptophan. N-Gehalt 0,16%, was (unter Vernachlässigung des Rest-N) 1% Eiweiß entspricht. Demnach würde Milcheiweiß 6,3% Tryptophan enthalten.

Nunmehr wurden 50 ccm der Milch nach dem Verfahren von Schmidt (Abderhaldens Arbeitsmeth. 5, 449) auf 500 ccm verdünnt; es wurde 0,4 proz. Essigsäure hinzugefügt und unter Erwärmen auf 40° $^1/_2$ Stunde CO_2 eingeleitet; sodann filtriert. Das so erhaltene ganz klare Filtrat wurde am Wasserbade eingedunstet, das ziemlich reichliche Koagulum abfiltriert und durch Erwärmen mit 30 proz. Natronlauge in Lösung gebracht. Die klare Lösung ergab colorimetrisch $\left.\begin{matrix}0{,}049\\0{,}047\end{matrix}\right\}$ 0,048% Tryptophan, enthielt in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0070\\0{,}0073\end{matrix}\right\}$ 0,0072 g N, also 0,144% N, was 0,9% Eiweiß entspricht. Demnach enthielt dieses Molkeneiweiß 5,3% Tryptophan.

Weitere 100 ccm der Frauenmilch wurden, um ein völlig fettfreies Koagulum zu gewinnen, in 200 ccm Alkohol eingegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und in Kjeldahllauge in der Wärme gelöst. Die Lösung enthielt in 10 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0081\\0{,}0093\end{matrix}\right\}$ 0,0087 g N, demnach 0,087% N, entsprechend 0,54% Eiweiß. Colorimetrisch fand sich $\left.\begin{matrix}0{,}032\\0{,}042\end{matrix}\right\}$ 0,037% Tryptophan, woraus sich für das Gesamteiweiß der Milch ein Gehalt von 6,8% Tryptophan berechnet.

Weitere 80 ccm derselben Milch wurden der Spontangerinnung überlassen. Nach längerem Stehen wurde das spärliche Gerinnsel abfiltriert und in 20 ccm Kjeldahllauge gelöst. Aus der zuerst trüben Lösung schied sich das Fett beim Stehen vollständig an der Oberfläche ab. Die Lösung erwies sich aber als sehr eiweißarm und gab eine so schwache Voisenet-Reaktion, daß die Colorimetrie nicht exakt durchgeführt werden konnte. Jedenfalls war weniger als 0,01% Tryptophan vorhanden, daher die Caseinfraktion sicherlich weniger als $2^1/_2$% Casein enthielt.

Weitaus die Hauptmenge des Eiweißbestandes (mehr als $^3/_4$ derselben entsprechend) fand sich in der Molkenfraktion. Dieselbe wurde koaguliert und das Koagulum in Kjeldahllauge gelöst. Die Lösung enthielt 0,226% N, demnach 1,47% Eiweiß und 0,09% Tryptophan, woraus sich für das Molkeneiweiß ein Tryptophangehalt von 6,1% ergibt.

d) Mischcolostrum mit 1,9% Fettgehalt, 0,24% N. und einem Eiweißgehalt von 1,5%. Der Versuch der Caseinfällung nach Schmidt (s. o.) blieb resultatlos und ergab kein filtrierbares Koagulum. Es wurde nunmehr eingedampft, das flockige Koagulum abfiltriert und in Kjeldahllauge in der Wärme gelöst. Die Lösung enthielt in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0085\\0{,}0087\end{matrix}\right\}$ 0,0086 g N, also 0,172% N, was 1,08% Eiweiß (mit 16%) N entspricht. Die Colorimetrie ergab 0,068% Tryptophan. Für das Colostrumeiweiß ergab sich sonach ein Tryptophangehalt von 6,3%.

e) **Mischcolostrum** mit einem Fettgehalte von 2,6%. Die Caseinausfällung nach **Schmidt** erwies sich auch in diesem Falle als untunlich. Es wurde nunmehr am Wasserbade auskoaguliert, das Koagulum durch Dekantation abgetrennt, in 30 proz. Natronlauge gelöst, wobei sich das Fett als zusammenhängende Masse an der Oberfläche abschied. Dasselbe wurde durch Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter beseitigt, der Äther am Wasserbade vertrieben. Nach Wasserzusatz wurde nunmehr eine klare Eiweißlösung erhalten. Diese enthielt in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0087\\0{,}0087\end{matrix}\right\}$ also 0,174% N, was 1,09% Eiweiß entspricht. Colorimetrisch ergab sich ein Tryptophangehalt von 0,094%, woraus für dieses Colostrumeiweiß ein **Tryptophangehalt von 8,5%** resultiert. Überblicken wir nunmehr die Resultate, so ergibt sich:

a) Milcheiweiß mit einem Gehalte von 3,64% Tryptophan
„ „ „ „ „ 6,3% „
c) 6,8%
6,1% „ Molkeneiweiß .
5,3%
d) „ (Colostrum) „ „ 6,3%
e) „ „ „ , 8,5% .

Es ergibt sich sonach die physiologisch bedeutsame Tatsache, **daß die Eiweißkörper der Frauenmilch denjenigen der Kuhmilch gegenüber durch einen um ein Mehrfaches höheren Tryptophangehalt ausgezeichnet sind.** Nach **König** enthält Kuhmilch im Mittel 3% Casein und 0,5% Molkeneiweiß, Frauenmilch dagegen 0,8% Casein und 1,2% Molkeneiweiß. **Es wird demnach der geringere Eiweißgehalt der Frauenmilch zum mindesten in bezug auf eine für die Wachstumsvorgänge besonders wichtige Proteinkomponente, das Tryptophan, durch einen höheren Gehalt der Eiweißsubstanz an diesem Baumateriale ausgeglichen.**

Zusammenfassung.

1. Die von **Voisenet** angegebene Eiweißreaktion, i. e. die schöne Violettfärbung, welche eintritt, wenn man eine Eiweißsubstanz in wässeriger Lösung oder Suspension mit schwachnitrithaltiger, konzentrierter Salzsäure in Gegenwart einer Spur von Formaldehyd versetzt, ist an die **Tryptophangruppe** des Eiweißmoleküls in streng spezifischer Weise geknüpft.

2. Der Ablauf dieser Reaktion erwies sich bei genauer Einhaltung gewisser Versuchsbedingungen (sorgfältige Berücksich-

tigung der relativen Mengen von Tryptophan, salpetriger Säure, Formaldehyd, Salzsäure und Wasser) als ein derart regelmäßiger, daß ein Verfahren zur colorimetrischen Bestimmung des Tryptophans auf diesem Prinzipe basiert werden konnte. Durch den Vergleich mit der Farbenreaktion einer 0,1 proz. Standardlösung von reinem Tryptophan kann der Gehalt einer Flüssigkeit an Tryptophan mit Hilfe des Dubosq-Colorimeters ermittelt werden, und zwar ebensowohl der Gehalt an freiem, als auch an gebundenem Tryptophan, ohne daß eine vorausgehende Abspaltung desselben aus dem Verbande des Eiweißmoleküls erforderlich wäre.

3. Es wurde so im normalen Pferdeserum ein Tryptophangehalt von 0,20—0,40% ermittelt. Fraktionierungsversuche ergaben für die Albuminfraktion eines solchen Serums Werte von 1,2—1,5%, für die Globulinfraktion dagegen solche von 4,1—4,7%; in anderen Globulinen (aus Rinderblutserum und Exsudaten) fanden sich 4,6—6,1% Tryptophan. Die globulinartigen Eiweißkörper der untersuchten tierischen Flüssigkeiten erscheinen sonach den Albuminen gegenüber durch einen weit höheren Tryptophangehalt ausgezeichnet.

4. Untersuchungen über den Tryptophangehalt der Milch haben ergeben, daß das Casein der Kuhmilch rund 2% Tryptophan enthalte. Ein ähnlicher Tryptophangehalt scheint auch für das Molkeneiweiß der Kuhmilch die Regel zu sein. Dagegen erscheint das Eiweiß der Frauenmilch demjenigen der Kuhmilch gegenüber durch einen um ein Mehrfaches höheren Tryptophangehalt ausgezeichnet zu sein. Es wird demnach in bezug auf das für den Wachstumsvorgang so wichtige Tryptophan der geringere Eiweißgehalt der Frauenmilch durch einen höheren Gehalt des Eiweißmateriales an dieser Komponente ausgeglichen.

Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan. II.

Methodische Untersuchungen über die colorimetrische Tryptophanbestimmung auf Grund der Voisenetschen Reaktion, sowie über die Anwendung derselben auf Eiweißkörper und Organe.

Von

Otto Fürth und **Fritz Lieben.**

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Universitätsinstitutes.)

(Eingegangen am 12. Juni 1920.)

I. Methodische Untersuchungen über die Voisenetsche Reaktion.

Nachdem in der vorangehenden Arbeit (O. Fürth und E. Nobel) das Wesen der Voisenetschen Reaktion nur in seinen Hauptzügen erörtert und die Anwendungsart derselben auf das Blutserum und die Milch dargetan worden ist, bedarf die dort angegebene Methode noch einer ausreichenden experimentellen Begründung. Es soll nunmehr zunächst unsere Aufgabe sein, unsere in dieser Richtung gesammelten Erfahrungen zu sichten und (unabhängig von der zeitlichen Reihenfolge unserer Versuche) systematisch geordnet wiederzugeben.

1. Spezifität der Voisenetschen Reaktion. Weder die aliphatischen Bausteine des Eiweißmoleküles, wie das Leucin, Alanin, Glykokoll und die Asparaginsäure, noch aber das Tyrosin, Phenylalanin, Histidin und Prolin geben eine Andeutung der Reaktion. Dieselbe fehlt auch in bezug auf das Tryptophan unvollständigen Proteinen, wie der Gelatine und dem Fibroin. Aus dem Umstande, daß die Gelatine, obwohl sie 6% l-Oxyprolin enthält[1]), keinen Voisenet gibt, geht hervor, daß auch dieses nicht an der Reaktion beteiligt ist. Dieselbe verschwindet bei andauernder Säurehydrolyse gleichzeitig mit dem

[1]) Vgl. C. O. Johns und D. Breise Jones, Journ. of biol. Chem. 36, 319. 1918.

Tryptophan, welches sich dabei an der Bildung der Melanoidinabscheidung wesentlich beteiligt. (In bezug auf das Oxytryptophan mangeln uns jegliche Erfahrungen.)

Das Indol zeigt ein dem Tryptophan ähnliches Verhalten. Allerdings gibt es bekanntlich mit Nitrit und Mineralsäure auch bei Abwesenheit von Formaldehyd bereits eine Rotfärbung. Andererseits sahen wir, als wir 2 ccm einer 0,1 proz. wässerigen Lösung eines Kahlbaumschen Indolpräparates mit einem Tropfen Formaldehyd 2,5% und mit 20 ccm konz. HCl versetzten, eine langsam einsetzende rosenrote Färbung, auch ohne Nitritzusatz, auftreten. Eine intensive violettrote Färbung trat bei weiterem Zusatze von 10 Tropfen H_2O_2 0,05% auf. Auch bei der Reaktion mit Tryptophan kann (s. unten) das Nitrit durch Wasserstoffsuperoxyd vertreten werden.

2. Empfindlichkeit der Reaktion. Eine Tryptophanlösung 1 : 25 000 (0 · 004%) gibt noch eine ausgesprochene, eine solche 1 : 50 000 (0 · 002%) nur noch eine schwach angedeutete Reaktion. In 2 ccm einer 0 · 004 %-Lösung sind 0 · 00008 g Tryptophan enthalten. 0 · 0001 g Tryptophan kann also mit Leichtigkeit nachgewiesen werden.

3. Gentianaviolettlösung als Standard. Für manche Zwecke insbesondere für die Beobachtung des zeitlichen Ablaufes der Reaktion erschien es erwünscht, einen fixen Standard an Stelle der immerhin innerhalb gewisser Grenzen veränderlichen Tryptophan-Standardlösungen zu setzen. Die letzteren wurden stets in der früher beschriebenen typischen Weise (2 ccm 0,1%, Tryptophanlösung + 1 Tropfen Formaldehyd $2^1/_2$% + 15 ccm HCl vom spez. Gew. 1,16 + 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05%, das Gemenge mit konz. HCl aufgefüllt auf 20 ccm) in graduierten Eprouvetten hergestellt.

Die Prüfung verschiedener frischbereiteter Standardlösungen ergab eine 0,01% wässerig-alkoholische Gentianaviolettlösung (abgesehen von ihrem mehr rötlichen Farbentone) als colorimetrisch annähernd gleichwertig einer

0,105%
0,108%
0,121%
0,116% } im Mittel 0,112 proz. Tryptophanlösung.
0,112%
0,108%
0,117%

4. Zeitlicher Verlauf der Reaktion. Wird die Reaktion in der sub 3 beschriebenen typischen Art derart ausgeführt, daß die Nitritlösung unmittelbar nach dem Ansetzen der Probe hinzugefügt wird, so tritt die Farbenreaktion langsam ein und erreicht nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde ihr Maximum.

So ergab z. B. eine in typischer Weise angesetzte 0,1 proz. Tryptophan-Standardlösung im Dubosq-Colorimeter mit einer 0,01 proz. Gentianaviolettlösung bei einer Schichtendicke von 10 mm verglichen, folgende Ablesungen:

nach	5	Minuten	gleiche	Färbungsintensität	bei	einer	mittl.	Schichtendicke	v.	12,2	mm
„	15	„	„	„	„	„	„	„	„	10,5	„
„	25	„	„	„	„	„	„	„	„	9,8	„
„	35	„	„	„	„	„	„	„	„	9,4	„
„	60	„	„	„	„	„	„	„	„	9,4	„

Ein analoger Versuch mit einer stärker verdünnten, nur 0,03 proz. Tryptophanlösung ergab beim Vergleiche mit einer 0,01 proz. Gentianaviolettlösung:

nach	5	Minuten	gleiche	Färbungsintensität	bei	einer	mittl.	Schichtendicke	v.	31,9	mm
„	15	„	„	„	„	„	„	„	„	26,2	„
„	25	„	„	„	„	„	„	„	„	24,4	„
„	35	„	„	„	„	„	„	„	„	24,0	„

Ganz anders dagegen, wenn man, was entschieden zweckmäßiger ist, die mit Formaldehyd und konz. HCl versetzte tryptophanhaltige Probe eine Zeitlang, mindestens aber 5 Minuten lang, sich selbst überläßt (wobei die erste Phase der Reaktion sich durch Eintritt einer Gelbfärbung bemerkbar macht) und erst im Nachhinein Nitrit hinzufügt. Dann sieht man unter den einfließenden Nitrittropfen sofort das Auftreten eines intensiv violettgefärbten Ringes und beim Umschütteln der Flüssigkeit wird die Färbung innerhalb ganz kurzer Zeit maximal.

Beispiel: Eine Reihe von Proben von je 2 ccm einer frisch bereiteten 0,1 proz. Tryptophanlösung wurden mit 1 Tropfen 2 proz. Formaldehyds und mit 15 ccm konz. HCl versetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% hinzugefügt. Es wurde sodann mit konz. HCl auf 20 ccm aufgefüllt, durchgemischt und colorimetriert. Als Vergleichsstandard diente eine bereits 2 Stunden vorher in typischer Weise angesetzte, also sicherlich bereits maximal gewordene Voisenetprobe mit 0,1 proz. Tryptophanlösung.

Nitritzusatz	sofort	ergab	eine	Färbung	entsprechend	einer	0,080	proz.	Tryptophanlösung
„	nach 5 Min.	„	„	„	„	„	0,098	„	„
„	„ 15 „	„	„	„	„	„	0,090	„	„
„	„ 30 „	„	„	„	„	„	0,095	„	„
„	„ 1 Std.	„	„	„	„	„	0,102	„	„
„	„ 2 „	„	„	„	„	„	0,111	„	„
„	„ 4 „	„	„	„	„	„	0,111	„	„
„	„ 22 „	„	„	„	„	„	0,098	„	„

Wir pflegen gegenwärtig vor dem Nitritzusatz eine Wartezeit von etwa 10 Min. einzuschalten und zwar sowohl beim Ansatze der Standardprobe als der zu prüfenden Lösungen. Es versteht sich von selbst, daß in beiden Fällen ein gleichartiger Vorgang unbedingt eingehalten werden muß.

5. Verdünnungsversuche. Für die Verwendbarkeit der Voisenetschen Reaktion zu Zwecken quantitativer Bestimmung war die Frage entscheidend, ob der Grad der eintretenden Färbung dem Verdünnungsgrade wirklich annähernd proportional sei. Wir haben daher mehrere Versuchsreihen in der Art ausgeführt, daß wir die 0,1 proz. Standardlösung mit Wasser in verschiedenem Grade verdünnt haben und nun mit je 2 ccm der verschiedenen Verdünnungsstufen die Voisenet-Reaktion in der typischen Art (2 ccm Probe + 1 Tropfen Formaldehyd $2^1/_2$% + 15 ccm konz. HCl + 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% + HCl aufgefüllt auf 20 ccm) ansetzten:

Versuch a)	statt	0,120%	Tryptophan	0,105, 0,113%	gefunden,	Fehler	−12%, −6%
	„	0,140%	„	0,137%	„	„	−2%
	„	0,160%	„	0,166%	„	„	+4%
	„	0,200%	„	0,185%	„	„	−7%
Versuch b)	„	0,080%	„	0,081%	„	„	+1%
	„	0,060%	„	0,062%	„	„	+3%
	„	0,040%	„	0,037%	„	„	−8%
Versuch c)	„	0,20 %	„	0,16, 0,17%	„	„	−20%, −15%
	„	0,30 %	„	0,25, 0,26%	„	„	−17%, −13%
	„	0,40 %	„	0,33, 0,33%	„	„	−18%, −18%
	„	0,50 %	„	0,44, 0,44%	„	„	−12%, −12%
Versuch d)	„	0,10 %	„	0,08, 0,09%	„	„	−20%, −10%
	„	0,05 %	„	0,042%, 0,042%	„	„	−16%, −16%
	„	0,025%	„	0,025%, 0,022%	„	„	− 0%, −12%

Bei einem weiteren Versuche wurde der colorimetrische Vergleich anstatt mit Hilfe des Dubosq-Apparates, mit Hilfe des Hüfnerschen Spectrophotometers durchgeführt.

Versuch e)	statt	0,050%	Tryptophan	0,052%	gefunden	Fehler	+ 4%
	„	0,025%	„	0,027%	„	„	−12%
	„	0,018%	„	0,017%	„	„	− 5%

Wir haben derartige Versuche nicht wiederholt, da die aus dem offenen Troge des Spektrophotometers entweichenden Salzsäuredämpfe eine Gefahr für den Apparat bedeuteten.

Dagegen war ein auf dem Gebiete der Spectrophotometrie besonders erfahrener Kollege, Herr Dr. D. Charnas, so liebenswürdig, einen weiteren Versuch dieser Art mit Hilfe eines Königschen Spektrophotometers modernster Konstruktion durchzuführen, das mit seinen verschraubbaren Trögen auch das Arbeiten mit konzentrierter Salzsäure gestattet. Wir werden noch bei späterer Gelegenheit auf die wertvollen Beobachtungen von Charnas zurückkommen.

Versuch f) 0,5 ccm Tryptophan + 1 Tropfen Formalin 1% + 19,5 ccm höchstkonzentrierte HCl-Lösung (spez. Gew. 1,2) +0,5 ccm $NaNO_2$ 0,05%

statt	0,020%	Tryptophan	0,022%	gefunden	Fehler	+10%
„	0,025%	„	0,029%	„	„	+15%
„	0,040%	„	0,038%	„	„	− 5%
„	0,050%	„	0,059%	„	„	+18%
„	0,060%	„	0,069%	„	„	+15%

Überblicken wir die Versuche, so ersehen wir, daß die Fehlergrenzen 20% nicht überschreiten und sich meist um 10% herum bewegen. Dieselben könnten sicherlich noch erheblich eingeengt werden. Sind doch die Mehrzahl der Versuche zu einer Zeit ausgeführt worden, wo wir mit der Methode noch nicht vollkommen vertraut waren und manche Fehlerquellen noch nicht zu vermeiden wußten. Jedenfalls ist aber die Proportionalität eine ausreichende, um die Reaktion von Voisenet den Zwecken der Physiologie dienstbar machen zu können.

6. Bedeutung des Nitritzusatzes. Bereits in der vorausgehenden Arbeit ist auseinandergesetzt worden, daß sowohl ein Zuviel als ein Zuwenig an Nitrit die Reaktion nicht zur vollen Entfaltung kommen läßt. Für 2 ccm 0,1 proz. Tryptophanlösung ist ein Zusatz von ungefähr 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% optimal. Charnas hat bei seinen spektrophotometrischen Versuchen auf 0,5—1,0 ccm 0,1 proz. Tryptophanlösung 0,5 ccm $NaNO_2$ 0,05% als richtigen Zusatz festgestellt. Ist die in die Reaktion gelangende Tryptophanmenge nicht von vornherein bekannt, so ist, wie schon früher geschildert, ein tastender Vorgang unerläßlich.

Da das Tryptophan eine freie Aminogruppe enthält, welche mit salpetriger Säure in der bekannten typischen Art sich umsetzen könnte, ergibt sich die Frage, ob nicht etwa eine derartige Umsetzung für das Zustandekommen der Reaktion von Voisenet wesentlich sei. Wird eine Tryptophanlösung mit einem großen Überschusse von Nitrit und Salzsäure versetzt und die salpetrige Säure weggekocht, so geht allerdings die gegenüber stärkeren oxydativen Einwirkungen aller Art recht empfindliche Voisenetreaktion unwiederbringlich verloren.

Wir gingen aber sodann derart vor, daß wir 5 ccm 0,1 proz. Tryptophanlösung mit 5 ccm $NaNO_2$ 0,05% versetzten und 2 ccm HCl 10% hinzufügten. Dabei gelangt noch immer mehr HNO_2 zur Wirkung, als der für die NH_2-Gruppe des Tryptophans berechneten Menge entspricht; es wurde nunmehr erwärmt und andauernd Luft durchgeleitet, um den HNO_2-Überschuß zu beseitigen. Hinterher gab die Flüssigkeit noch eine sehr starke Voisenet-Reaktion. Es macht also den Eindruck, als ob die NH_2-Gruppe des Tryptophans für die Reaktion nicht wesentlich sei. Dafür spricht auch der Umstand, daß eine bei alkalischer Reaktion mit Benzoylchlorid oder Benzolsulfochlorid ge-

schüttelte Tryptophanlösung noch positive Voisenetreaktion gab[1]). Eine präzise Beantwortung der Frage würde allerdings quantitative Versuche nach Van Slyke's Schema erfordern.

Daß die Wirkung des Nitritzusatzes bei der typischen Voisenetreaktion in erster Linie eine schwach-oxydative und keine diazotierende sei, geht aus dem Umstande hervor, daß das Nitrit, wie schon Voisenet beobachtet hat, durch einen Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd vertreten werden kann.

Wir fügten zu 2 ccm Tryptophan 0,1% einen Tropfen Formaldehyd 2½% und 15 ccm konz. HCl hinzu; sodann aber 10 Tropfen H_2O_2 3%. Es trat eine intensive, jedoch rasch verschwindende Blaufärbung ein. Wiederholung des Versuches mit H_2O_2 0,5% ergab eine allmählich sich entwickelnde, schwächere Färbung. H_2O_2 0,05% gab eine langsam eintretende, jedoch andauernde schöne dunkelviolette Färbung, der, ähnlich wie der Voisenetreaktion, ein Absorptionsstreifen im gelbroten Teile des Spektrums entsprach.

7. Variation des Formolzusatzes. Ebenso wie der Nitritzusatz muß auch der Formolzusatz innerhalb enger Grenzen erfolgen, wenn man eine maximale Reaktion erzielen will:

Beispiel: In einer Serie wurden je 2 ccm 0,1 proz. Tryptophanlösung mit je einem Tropfen Formaldehydlösung von wechselnder Konzentration (0,1–4%) und 15 ccm konz. HCl Salzsäure gemischt. Nach 10 Minuten Wartezeit wurden 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% hinzugefügt und alle Proben auf das Volumen von 20 ccm mit konz. HCl ergänzt. Diejenige Probe, welche mit 2½% Formaldehydlösung versetzt worden war, diente als Standard (0,1% Tryptophan). Bei colorimetrischer Umrechnung entsprach die Färbung in der mit

einem	Tropfen	0,1 %	Formaldehydlsg.	versetzt.	Probe	einer	0,020	proz.	Tryptophanlsg.	(Standard)
„	„	0,25%	„	„	„	„	0,044	„	„	
„	„	0,5 %	„	„	„	„	0,050	„	„	
„	„	1,0 %	„	„	„	„	0,068	„	„	
„	„	1,5 %	„	„	„	„	0,071	„	„	
„	„	2,0 %	„	„	„	„	0,100	„	„	
„	„	3,0 %	„	„	„	„	0,088	„	„	
„	„	4,0 %	„	„	„	„	0,070	„	„	

Eine einfache Proportionalität zwischen Formaldehydzusatz und Intensität der Reaktion besteht sonach nicht. Den optimalen

[1]) Nach Ehrlich (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 45, I, 883. 1912) gibt das Tryptophol

```
 /\———— C — CH₂ · CH₂ · OH
|  |      ||
|  |      CH
 \/\NH /
```

noch die Glyoxylsäure analog wie das Tryptophan. Diese Reaktion scheint aber der Voisenetreaktion im allgemeinen parallel aufzutreten.

9*

Formaldehydzusatz bei unserer Versuchsanordnung finden wir etwa einem Tropfen einer 2proz. Formaldehydlösung entsprechend.

8. Einfluß der Salzsäurekonzentration und störende Wirkung des Wassers.

Wird eine in gewöhnlicher Weise angesetzte Voisenetprobe nach Ablauf der Reaktion mit konzentrierter Salzsäure verdünnt, so ändert sich die Färbungsintensität annähernd proportional der Verdünnung, z. B. (spektrophotometrische Beobachtung)

bei 1/2 Verdünnung einer 0,1 proz. Lösung statt 0,050% gefunden 0,052%
„ 1/4 „ „ 0,1 „ „ „ 0,025% „ 0,027%

Ganz anders dagegen, wenn mit Wasser verdünnt wird: Bereits bei Verdünnung mit dem 3fachen Volumen sieht man die Farbe gänzlich verblassen.

Die von Voisenet gewählten Versuchsbedingungen, der mehrere Kubikzentimeter der zu prüfenden Flüssigkeit mit dem 3fachen Volumen nitrithaltiger Salzsäure versetzt hat, waren wenig günstige, da die Proben relativ viel zu viel Wasser enthalten hatten, um einen optimalen Reaktionsablauf zu ermöglichen. Wir haben immer je 2 ccm wässeriger Flüssigkeit mit konzentrierter Salzsäure auf 20 ccm aufgefüllt, haben also das 9fache Volumen Salzsäure angewandt und glaubten damit zunächst die abschwächende Wirkung des Wassers völlig ausgeschaltet zu haben.

Daß dies nicht ganz der Fall ist, lehrt nachstehender Versuch:

Wir haben eine gewöhnliche konzentrierte Salzsäure vom spez. Gew. durch Einleiten gasförmiger Salzsäure auf ein spez. Gew. von 1,18 gebracht und nun mit beiden Säuren Parallelproben angesetzt. Es ergab:

die Probe mit HCl sp. G. 1 · 15		die Probe mit HCl sp. G. 1 · 18
0,10	gegen	0,14
0,050	„	0,063
0,025	„	0,039

Die Proportionalität bleibt allerdings auch hier annähernd gewahrt

1	:	1/2	:	1/4
0,140	:	0,063	:	0,039
statt		0,070		0,035

Wenn man Standardlösung und Probe mit derselben Salzsäure ansetzt, so dürfte es für die Colorimetrie ziemlich gleichgültig sein, ob die konzentrierte Salzsäure etwas mehr oder weniger gasförmiger HCl enthält.

Arbeitet man dagegen mit dem Spektrophotometer, so wird bei Feststellung des Absorptionsverhältnisses als Maßes für die absolute Intensität der Färbung dieser Umstand sehr schwer ins Gewicht fallen.

So hat sich beim Arbeiten mit Salzsäure spez. Gew. 1,15 unter Berücksichtigung, daß $A = \frac{c}{E}$ ergeben (c bedeutet die Konzentration in Gramm im Kubikzentimeter, wobei zu beachten ist, daß 2 ccm der Probe auf 20 ccm mit Salzsäure, also auf das 10fache verdünnt worden sind. Also z. B. für die 0,1 proz. Tryptophanlösung ist c = 0,0001. A ist das Absorptionsverhältnis, E der Extinktionskoeffizient).

Verdünnung der Standardlösung auf	1/1	E = 1,15	A = 0,000087
„ „ „ „	1/2	E = 0,596	A = 0,000084
„ „ „ „	1/4	E = 0,308	A = 0,000081
„ „ „ „	1/6	E = 0,210	A = 0,000081
		Mittel	0,000083.

Einen anderen Versuch hat Herr Kollege Charnas unter Anwendung höchstkonzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,2) unter jenen Bedingungen ausgeführt, die sich ihm als für die spektrophotometrische Bestimmung als die günstigsten ergeben hatten (Spektrum: Ein verwaschener Streifen auf λ = 5700 A[1])]:

0,2—1,0 ccm 0,1 proz. Tryptophanlösung + 1 Tropfen Formaldehyd 1% + konz. HCl (spez. Gew. 1,2) ad 19,5 ccm + 0,5 ccm $NaNO_2$ 0,05%. Die Messung wurde nach 5 Minuten in einem geschlossenen Rohre bei 2 cm Schichtlänge ausgeführt.

Mit 0,2 ccm 0,1% Tryptophan auf 20 ccm ergab sich E =	0,47748
0,25	0,64425
0,4	0,85479
0,5	1,30927
1,0	2,21341

auf 1 ccm umgerechnet: im Mittel E = 2,410 (mit ca. 10% mittlerem Fehler) oder E = 1,205 für 1 cm Schichtendicke.

Daraus ergibt sich für 1 ccm Schichtendicke unter Berücksichtigung der Verdünnung auf 20 ccm: $A = \frac{c}{E} = \frac{0,001}{20 \cdot 1,205} = 0,0000415$. Es ergab sich also bei Anwendung von HCl spez. Gew. 1,15 A = 0,00083, bei Anwendung von HCl spez. Gew. 1,20 A = 0,000415.

Die Reaktion hat also in letzterem Falle zu einer (ceteris paribus) doppelt intensiven Färbung geführt.

Es sei noch erwähnt, daß wir gelegentlich Proben angeblich reiner konzentrierter Salzsäure in Händen hatten, mit denen sich die Reaktion infolge der Anwesenheit einer störenden Substanz (Chlor?) überhaupt nicht

[1]) A (Angström-Einheit = 1/10 Milliontel Millimeter).

ausführen ließ. Auf die Reinheit und ausreichende Konzentration der bei der Reaktion benutzten Salzsäure ist daher stets ein besonderes Augenmerk zu richten.

9. Oxydative und reduktive Faktoren. Die fertige Voisenetreaktion wird sowohl durch stärkere oxydative Eingriffe (z. B. Zusatz Bichromat in Schwefelsäure) als auch durch reduktive Faktoren (z. B. Zinkstaub) schnell zerstört. Auch gegenüber den Salzen des Kupfers und vieler anderer Schwermetalle ist die Reaktion so empfindlich, daß schon aus diesem Grunde nur Colorimetrirkuvetten in Anwendung kommen dürfen, bei denen jeder Kontakt der Flüssigkeit mit Metall ausgeschlossen erscheint.

Durch längeres Durchleiten sowohl von Luft als auch von Wasserstoff wird die Voisenetfärbung zerstört. Doch ist die Reaktion bei nicht allzulanger Dauer der Durchleitung durch neuerlichen Nitritzusatz regenerierbar. Bei längerer Dauer der Durchleitung wird dagegen die Reaktion infolge Abscheidung einer melanoidinartigen Substanz andauernd vernichtet.

Beispiele: a) Eine Voisenetreaktion wurde mit 0,10% Tryptophanlösung wie gewöhnlich angesetzt und sodann durch die Flüssigkeit Luft durchgeleitet; es trat erst die gewöhnliche rotviolette Färbung auf, die jedoch nicht maximal wurde, sondern bald zu Rotbraun verblaßte. Nach ca. 1 Stunde wurde die Probe noch einmal mit 10 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% versetzt: es trat alsbald wieder eine schöne Violettfärbung zutage, welche colorimetrisch einer 0,11 proz. Tryptophanlösung gleichkam.

b) Analoger Versuch, jedoch mit Wasserstoffdurchleitung. Die Violettfärbung verblaßt zu Weingelb. Bei neuerlichem Nitritzusatz schöne Violettfärbung, colorimetrisch 0,095% Tryptophan entsprechend.

Ob die Probe nach dem Ansatze von dem Zutritt des Luftsauerstoffes, etwa durch Paraffinölbedeckung geschützt wird oder nicht, spielt offenbar keine wesentliche Rolle.

Beispiel: 0,1% Tryptophanlösung als Standard (Nitritzusatz nach 10 Minuten). Eine andere Probe ergab nach 1 Stunde Luftdruckleitung und nachträglichem Nitritzusatze colorimetrisch 0,097% Tryptophan. Eine weitere Probe nach einstündigem Stehen mit Nitrit versetzt: 0,114% Tryptophan. Eine Parallelprobe, jedoch sogleich nach Zufügen der Salzsäure mit Paraffinöl bedeckt, wurde nach 1 Stunde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig mit Nitrit versetzt und unter Vermeidung jedes Luftzutrittes gemischt: 0,109% Tryptophan.

10. Abscheidung des Voisenetfarbstoffes. Während in kolloidaler Bindung befindliches Tryptophan (z. B. in den

Eiweißkörpern des Blutserums) die Voisenetfärbungen tagelang unverändert beibehalten kann, trüben sich mit reinen Tryptophanlösungen angesetzte Voisenetproben nach einiger Zeit. Aus konzentrierter, etwa 0,2—0,5 proz. Tryptophanlösungen setzt sich aus der anfänglich dunkelvioletten Flüssigkeit nach eintägigem Stehen ein schwärzlich-violetter Bodensatz unter Entfärbung der überstehenden Flüssigkeit ab. Derselbe, abfiltriert und mit konz. HCl gewaschen, erweist sich als unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, konz. Salzsäure und Schwefelsäure. Auch in Natronlauge und Ammoniak erweist sich der Bodensatz als unlöslich; doch erfolgt darin ein Farbenumschlag in Ockerfarbe. Nach dem Trocknen präsentiert sich die so behandelte Substanz als ockerfarbenes Pulver. Die Beziehungen derartiger Niederschlagsbildungen zu Melanoidinen sollen eventuell in einer späteren Mitteilung erörtert werden.

11. Unvollkommene Haltbarkeit von Tryptophanlösungen. Das Tryptophan ist eine ziemlich zersetzliche Substanz und wir hatten bei der Herstellung ausreichend haltbarer Standardlösungen gewisse Schwierigkeiten zu überwinden.

Von dem Versuche, Tryptophanstandardlösungen in konzentrierter Salzsäure zu verwenden, sind wir sehr bald abgekommen, da sich solche Lösungen allmählich beim Stehen unter Abnahme ihres Tryptophangehaltes schwärzen. Auch Tryptophanlösungen in verdünnter (etwa $^n/_{20}$) Salzsäure oder verdünnter Natronlauge zeigten innerhalb einiger Wochen eine sehr merkliche Abnahme des colorimetrischen Titers. Am zweckmäßigsten erwies es sich, bei Herstellung einer 0,1 proz. Tryptophanstandardlösung eine 2 proz. Natriumfluoridlösung als Lösungsmittel direkt zu verwenden. Die hydrolytische Dissoziation der alkalisch reagierenden Lösung erteilt derselben ein ausreichendes Lösungsvermögen und ihre antiseptische Kraft ist groß genug, um der Invasion von Schimmelpilzen und Bakterien ein wenn auch nicht absolutes, so doch ziemlich wirksames Hindernis entgegenzustellen. Eine derartige Standardlösung haben wir $2^1/_2$ Monate ohne jegliche Abnahme ihres colorimetrischen Titers bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Man wird aber in praxi jedenfalls gut daran tun, den colorimetrischen Titer der Standardlösungen von Zeit zu Zeit mit einer ganz frisch bereiteten

Tryptophanlösung oder doch zum mindesten mit Hilfe einer 0,01 proz. wässerig alkoholischen Gentianaviolettfärbung zu kontrollieren[1]).

II. Verfahren zur Tryptophanbestimmung in Proteinen.

1. Tryptophanzusatz zu Gelatinelösungen. Die Anwendung der Voisenetschen Reaktion auf die Tryptophanbestimmung in Eiweißlösungen setzt die Feststellung voraus, ob der Ablauf der Reaktion nicht etwa durch die Anwesenheit von Proteinen als solchen gestört werde.

Um diese Frage in exakter Weise beantworten zu können, gingen wir derart vor, daß wir Lösungen reiner Gelatine, die keine Spur von Voisenetscher Reaktion gaben, mit bekannten Mengen Tryptophans versetzten und sodann die colorimetrische Bestimmung in typischer Weise vornahmen.

Versuch a): 1 proz. Gelatinelösung, 0,1% Tryptophan enthaltend: gefunden 0,085% Tryptophan statt 0,100%, Fehler 15%.

Versuch b): Gefunden 0,096% Tryptophan statt 0,100%, Fehler 4%.

Versuch c): 1 proz. Gelatinelösung, enthaltend 0,08% Tryptophan: gefunden 0,072% Tryptophan statt 0,080%, Fehler — 10%.

Versuch d): 1 proz. Gelatinelösung, enthaltend 0,1% Tryptophan: gefunden 0,106% Tryptophan statt 0,100, Fehler + 6%.

Versuch e): 50 ccm 1 proz. Gelatinelösung wurden mit 0,048 g Tryptophan (in 2 proz. NaF-Lösung gelöst), versetzt und das Volumen im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt: gefunden 0,045 g Tryptophan statt 0,048, Fehler — 6%.

Versuch f): 0,046 g Tryptophan wurde in wenig verdünnter HCl gelöst und die Lösung im Meßkolben mit 1 proz. Gelatine auf 100 ccm aufgefüllt: gefunden 0,043 g Tryptophan statt 0,046, Fehler — 5%.

Versuch g): 0,056 g Tryptophan mit einigen Tropfen HCl gelöst, dazu 50 ccm Gelatine 1%; im Meßkolben auf 100 ccm aufgefüllt: gefunden 0,063 g Tryptophan statt 0,056, Fehler + 12%.

Die Übereinstimmung ist als eine bei Berücksichtigung der Schwierigkeiten der Methode recht befriedigende zu bezeichnen, insofern sich die Fehler zwischen 4—15%, also um 10% herum bewegen.

Da also die Methode in einem System Tryptophan + Gelatine befriedigend funktioniert, lag für uns auch kein Grund vor,

[1]) Man beachte aber, daß die Gentianaviolettlösung im Dunkeln in einer gefärbten Flasche aufbewahrt werden möge. Beim Stehen im Lichte vermindert sich auch ihre Färbekraft.

den direkten Bestimmungen in gelösten tryptophanhaltigen Eiweißkörpern, wie sie in der ersten Arbeit (Fürth und Nobel) in bezug auf Proteine des Blutserums und der Milch zur Anwendung gelangt sind, Mißtrauen entgegenzubringen.

2. Zerstörung des Tryptophans durch Säurehydrolyse. Weit schwieriger als für leichtlösliche Eiweißkörper, lagen die Verhältnisse für an sich schwerlösliche Proteine, wie z. B. das Keratin, oder für koagulierte Proteine, wie z. B. das Fibrin.

An die Möglichkeit, derartige Proteine einer Säurehydrolyse zu unterwerfen und sodann das Tryptophan zu bestimmen, konnte von vornherein nicht gedacht werden. Mag auch reines Tryptophan gegenüber Säureeinwirkung nicht allzu empfindlich sein, so ist doch die Zerstörung des Tryptophans im Verbande des Eiweißmoleküls bei der Hydrolyse von R. A. Gortner (und Mitarbeitern)[1]) zur Genüge dargetan worden. Auch C. O. Johns und D. B. Breise[2]) haben kürzlich die Tatsache, daß das Tryptophan im Eisweiß bei der Säurehydrolyse vollständig zerstört werde, nachdrücklich betont. Nach Annie Homer[3]) wird reines Tryptophan von Säure nur langsam zerstört, schnell jedoch bei Anwesenheit von Oxydationsmitteln. Gelegenheit zur Interkurrenz oxydativer Vorgänge einerseits, von Aldehydkondensationen (Gortner) andererseits ist aber bei der Säurehydrolyse, von Proteinen reichlich gegeben.

Da diese Zerstörung nun aber mit der Melanoidinbildung Hand in Hand geht, diese letztere aber durch die Gegenwart von Reduktionsmitteln hintangehalten wird, konnte man daran denken, etwa durch Salzsäurehydrolyse bei Gegenwart eines solchen vielleicht das Tryptophan vor Zerstörung bewahren zu können. Daß dies nicht der Fall ist, lehrt nachstehender Versuch:

10 g feuchten Fibrins (ca. 2 g trockenen Fibrins entsprechend) wurden mit 50 ccm konz. HCl und 5 g Zinnchlorür in einem Kölbchen am Wasserbade mit aufgesetztem Steigrohre erwärmt. Es erfolgte schnelle Lösung. Die Flüssigkeit wurde nunmehr mit dem 4fachen Wasservolumen verdünnt,

[1]) R. A. Gortner u. Mitarbeiter, Journ. Amer. Chem. Soc. **37**, 1630. 1915; **39**, 2479, 2734. 1918. Journ. of Biol. Chem. **26**, 177. 1917.

[2]) C. O. Johns u. D. B. Breise, Journ. of Biol. Chem. **36**, 319. 1918. Chem. Centralblatt **1919** I, 650.

[3]) Annie Homer (Lister Inst. London u. Departm. of Biochemistry, Toronto), Journ. of Biol. Chem. **22**, 269. 1915.

das Zinn durch Schwefelwasserstoff gefällt und dieser vertrieben. Das wasserhelle Filtrat gab zwar noch deutliche Voisenetreaktion. Die Colorimetrie ergab jedoch schätzungsweise, daß immerhin die Hauptmenge des im Fibrin enthaltenen Tryptophans (s. unten) verlorengegangen war.

3. Alkalihydrolyse. Da die Säurehydrolyse demnach für die Zwecke der Tryptophanbestimmung in Eiweißkörpern nicht verwendbar erschien, blieb nur der Weg der Verdauung oder der Alkalihydrolyse übrig. Das Verhalten des Tryptophans beim Verdauungsvorgang wird Gegenstand einer weiteren Mitteilung sein. Hier soll zunächst die Frage erörtert werden, ob und inwieweit es möglich ist, Eiweißkörper durch Alkalilaugen in Lösung zu bringen, ohne den Tryptophanbestand zu schädigen.

Das Barytspaltungsverfahren von Annie Homer[1]) (vgl. die vorangehende Arbeit von Fürth u. Nobel, Abschnitt 1e) basiert auf der Voraussetzung, daß dies tatsächlich möglich sei. Es wurde aus Kasein durch Hydrolyse mit gesättigtem Barytwasser erhalten:

nach	20	Stunden	0,99	und	1,06%	Tryptophan
„	40	„	1,08	„	1,1 %	„
„	60	„	1,04	„	1,09%	„
„	80	„	1,04	„	1,13%	„

Es wird daraus gefolgert, daß die Barythydrolyse praktisch ohne Tryptophanverluste einhergehe. Daß aber die Autorin anderseits recht daran tat, wenn sie ihre Zahlen nur als Minimalwerte des Tryptophangehaltes betrachtet hat[2]), ergibt sich aus dem Umstande, daß das Kasein nach den Bestimmungen von Hopkins und Cole mindestens 1,5%, nach Fürth und Nobel (s. o. Abs. IV A) aber rund 2% Tryptophan enthält. Auch Annie Homer selbst ist bei einer ihrer Bestimmungen der Wahrheit mit 1,6% nahegekommen, während ihre anderen Werte bei 0,99 bis 1,24% liegen.

Nun werden aber bei dem Bestimmungsverfahren von Annie Homer, die bei der Alkalispaltung resultierenden Poly-

[1]) l. c.

[2]) l. c. S. 388: „From these considerations we see that, allthough the value obtained for the tryptophan content of a protein may be sometimes lower, than the true value, yet it can be taken as the lowest value assignable, to a protein under consideration. Such values, though only approximative, may be of the utmost service in experimentes of nutrition and in the preparation of synthetic diets.

peptide aus der tryptophanhaltigen Zersetzungsflüssigkeit durch Phosphorwolframsäurefällung beseitigt und es ist fraglich, ob die Verluste dieser Autorin nicht vielleicht in erster Linie durch den Umstand bedingt waren, daß eben ein Teil des Tryptophans noch nicht in Freiheit gesetzt war und daher mit den entfernten Polypeptiden der Bestimmung entzogen worden ist.

Versuch a): Wir haben, um über die Alkalieinwirkung auf das Tryptophan klar zu werden, zunächst 2 Pferdeblutserumproben zu je 200 ccm mit je 28 g Ätzbaryt versetzt. Die eine derselben wurde am siedenden Wasserbade, die andere aber im Autoklaven bis ca. 140° 8 Stunden lang erhitzt. Nach Beseitigung des Baryts mit Kohlensäure, des Restes mit Schwefelsäure wurde die Flüssigkeit auf das ursprüngliche Volumen von 200 ccm gebracht und colorimetriert. Während das native Serum 0,27% Tryptophan enthalten hatte, war die am Wasserbade erhitzte Probe auf 0,17%, die Autoklavenprobe aber auf 0,13% abgesunken. Es war also ein erheblicher Teil des Tryptophans in Verlust geraten.

Daß jedoch selbst konzentrierte Alkalilauge weder bei langdauernder Einwirkung bei Zimmertemperatur noch aber bei kurzdauernder Einwirkung in der Wärme das Tryptophan wesentlich schädigt, geht aus nachstehenden Versuchen hervor:

Versuch b): Globulin aus pleuritischem Exsudat in 30 proz. Natronlauge gelöst

Die Lösung enthielt ursprünglich	0,100%	Tryptophan
Colorimetrie nach 1 Woche bei Zimmertemperatur .	0,107%	„
„ „ $^1/_2$ Stunde am Wasserbade bei dem gleichen Volumen	0,112%	„
„ „ $1^1/_2$ Stunden am Wasserbade . .	0,097%	„

Thymushiston in NaOH 20% gelöst.

Lösung enthielt sofort	0,030%	Tryptophan
Colorimetrie 6 Wochen später	0,028%	„
„ nach $^1/_2$ Stunde am Wasserbade	0,031%	„

Conchiolin in NaOH 30% gelöst.

Lösung enthielt sofort	0,070%	Tryptophan
Colorimetrie 1 Woche später	0,078%	„
„ nach $^1/_2$ Stunde am Wasserbade . . .	0,073%	„

Keratin in NaOH 20% gelöst.

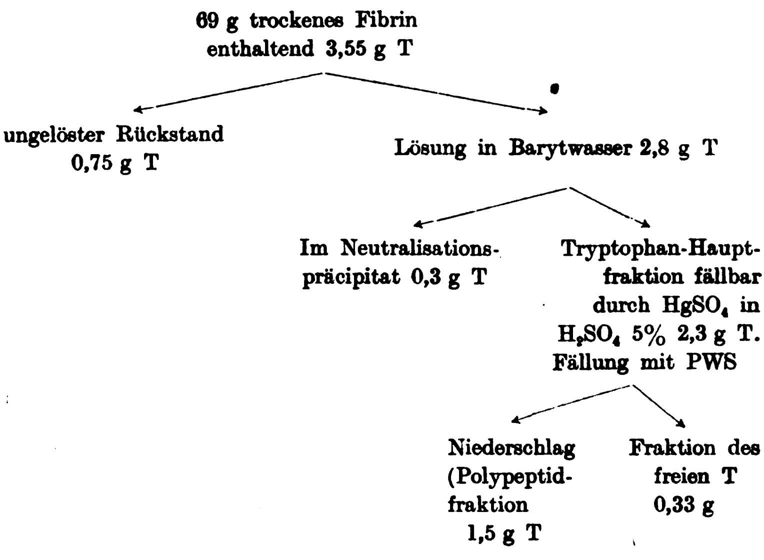
Lösung enthielt sofort	0,043%	Tryptophan
Colorimetrie 6 Wochen später	0,044%	„

Ein weiterer Versuch betraf die Einwirkung von Barytwasser auf Fibrin.

Versuch c): Unter Alkohol aufbewahrtes Fibrin (69 g trockenen Fibrins entsprechend) wurde in einem Liter gesättigten Barytwassers suspendiert und 16 Stunden lang am Wasserbade erwärmt. Es erfolgte größtenteils Lösung; doch blieb ein krümeliger Rückstand ungelöst.

Nunmehr ergab die Colorimetrie in der Flüssigkeit 2,8 g Tryptophan. Im ungelösten Rückstande fand sich (nach Lösung in NaOH 30%) noch 0,75 g Tryptophan, im ganzen also 2,8 + 0,75 = 3,55 g Tryptophan aus 69 g trockenen Fibrins; dies entspricht einem Tryptophangehalt von 5,2% (in guter Übereinstimmung mit anderen durch Verdauung des Fibrins ermittelten Werten; vgl. den nächsten Abschnitt!).

Der gelöste Fibrinanteil wurde nunmehr mit Schwefelsäure neutralisiert wobei noch ein Albuminanteil mit dem Bariumsulfat ausfiel. Derselbe enthielt 0,3 g Tryptophan. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure auf 5% davon gebracht und mit einer Lösung von Mercurisulfat 10% in H_2SO_4 5% vollständig ausgefällt (Tryptophanfällung nach Hopkins). Der Niederschlag, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, gab eine Lösung, die colorimetrisch noch 2,3 g Tryptophan enthielt. Weitere Fraktionierung durch Fällung mit einem Überschuß von Phosphorwolframsäure gab im Niederschlage (Polypeptidfraktion) 1,5 g Tryptophan, im Filtrate (Fraktion des freien Tryptophans nur mehr 0,33 g Tryptophan. Also schematisch:



Dieser Versuch hat uns in eindringlicher Weise darüber belehrt, daß es ganz aussichtslos ist, durch einen Vorgang, wie ihn Annie Homer eingehalten hatte, die Gesamtheit des in einem Proteine enthaltenen Tryptophans in freier Form abspalten und erst sodann bestimmen zu wollen. Betrug doch bei unserem (schrittweise kontrollierten) Versuche die schließliche

Tryptophanausbeute kaum $^1/_{10}$ der totalen Menge. Beim Kasein liegen allerdings die Verhältnisse offenbar günstiger als beim Fibrin, so daß Annie Homer immerhin mindestens die Hälfte der totalen Menge abzuspalten vermochte.

Ebenso ergebnislos verlief ein Versuch, die Tryptophanabspaltung mit Hilfe konzentrierter Natronlauge zu bewerkstelligen.

Versuch d): 35 g feuchten Fibrins, entsprechend 8 g trockenen Fibrins wurden durch Pepsin-Trypsinverdauung in 300 ccm in Lösung gebracht. Einem Tryptophangehalte von ca. 5% entsprechend, war das Quantum von ca. 0,4 g Tryptophan vorhanden. Es wurde nach Zusatz von 90 g Ätznatron 8 Stunden am Wasserbade erwärmt, sodann durch Phosphorwolframsäurefällung (in der in der nächsten Arbeit näher beschriebenen Weise) die Gesamtheit der hochmolekularen Polypeptide beseitigt. In dem (durch Baryt von PWS, durch CO_2 vom Barytüberschusse befreiten) Filtrate fand sich nur 0,06 g freies Tryptophan, also tatsächlich kaum $^1/_7$ der erwarteten Menge[1]).

Das durch Alkalihydrolyse aus Fibrin zunächst hervorgehende säurefällbare Albuminat („Albuminsäure“) ist dagegen tatsächlich unter Umständen tryptophanfrei:

Versuch e): 50 g alkoholfeuchten abgepreßten Fibrins wurden 1 Stunde lang mit 200 ccm 20proz. Kalilauge am Wasserbade erwärmt; es erfolgte schnelle Lösung. Das Volumen betrug 240 ccm. Die Lösung enthielt (nach Kjeldahl) 1,248 g N (was 7,8 g trockenen Fibrins entspricht) und ergab colorimetrisch einen Gehalt von 0,40 g Tryptophan, was einem Tryptophangehalte des Fibrins von 5,13% gleichkommt. Die Flüssigkeit wurde nunmehr mit HCl genau neutralisiert. Der Albuminatniederschlag, abfiltriert und in 3proz. Natronlauge wieder gelöst, erwies sich nunmehr als tryptophanfrei. Im Filtrate fanden sich noch 0,31 g Tryptophan, jedoch nicht in freier, sondern in gebundener Form (offenbar in Gestalt wasserlöslicher Polypeptide); denn die Flüssigkeit gab mit Bromwasser keine Andeutung der charakteristischen Tryptophanfärbung. Dabei war, wie eine Formoltitration nach Sörensen lehrte, 29% des Gesamt-N als formoltitrierbarer N abgespalten. Nach Beseitigung der Polypeptide durch das PWS-Barytverfahren resultierte eine biuretfreie Lösung, die überhaupt kein freies Tryptophan enthielt.

---

[1]) Die Einschaltung eines reduktiven Faktors zerstört das Tryptophan vollkommen. 10 g feuchten Fibrins wurden mit 50 ccm 30proz. KOH und 5 g Zinnchlorür einige Stunden am Wasserbade erwärmt. Es erfolgte Schwärzung infolge Sulfidabscheidung. Am nächsten Tage wurde mit Salzsäure angesäuert und der Albuminatniederschlag abfiltriert. Weder dieser noch das Filtrat gab Voisenet

Die kurzdauernde Einwirkung der konzentrierten Lauge in der Wärme hatte also in diesem Falle zwar eine vollständige Lösung ohne wesentliche Schädigung des Tryptophanbestandes herbeigeführt, ohne daß überhaupt eine Abspaltung freien Tryptophans noch begonnen hätte.

Unsere Erfahrungen überblickend, sind wir zu folgendem Resultate gelangt:

Will man in schwer löslichen Eiweißsubstanzen das Tryptophan bestimmen, so empfiehlt es sich, wofern man die Aufschließung nicht auf dem Wege der Verdauung bewerkstelligen kann oder will (diesbzgl. vgl. die folgende Abhandlung), dieselben durch nicht länger als nötig ausgedehnte Erwärmung mit 20 bis 30proz. Alkalilauge am Wasserbade in Lösung zu bringen. Mit 2 ccm der klaren Lösung setzt man dann in der typischen Weise den Voisenetversuch an. Beim Zusatze der konz. HCl fällt natürlich stets das Alkalichlorid aus und muß durch Filtration durch ein gehärtetes Filter (Schleicher und Schüll) beseitigt werden.

Da, wie allbekannt, jede Aminosäure beim andauernden Erwärmen mit starker Alkalilauge unter Ammoniakabspaltung langsam verändert wird, können auch unsere Zahlen streng genommen nur als Minimalzahlen gelten. In praxi dürfte aber dieser Fehler, wie obige Versuche lehren, gegenüber anderen Fehlerquellen nicht sonderlich belangreich sein. Durch Vorlage titrierter Säure haben wir uns übrigens gelegentlich davon überzeugt, daß die absolute Menge Ammoniaks, die bei unseren Versuchen tatsächlich entweicht, sehr gering ist und praktisch als N-Verlust nicht in Betracht kommt.

III. Tryptophangehalt einiger Proteine.

A. Fibrin.

a) Unter Alkohol aufbewahrtes, abgepreßtes Fibrin in NaOH 10% bei 40° im Laufe eines halben Tages in Lösung gebracht. 2,24 proz. Lösung (Kjeldahl) ergibt colorimetrisch 0,125% Tryptophan, daher Tryptophangehalt des Fibrins = 5,6%.

b) Unter Alkohol aufbewahrtes Fibrin, abgepreßt, in Na_2CO_3 5%, mit einigen Messerspitzen Pankreatin unter Zusatz von etwas Chloroform in den Brutofen gestellt. Es tritt bald vollständige Lösung ein. 5 ccm derselben enthalten $\left.\begin{matrix}0{,}0154\\0{,}0144\end{matrix}\right\}$ 0,0149 g N, 100 ccm 0,298 g N. Da Fibrin 16,9% N enthält, entspricht dies 1,76% Fibrin. Colorimetrie: 0,09% Tryptophan. Daher Tryptophangehalt des Fibrins = 5,1%.

c) $^1/_4$ kg frischen ausgewaschenen Fibrins wurde in 1 l Na_2CO_3 5% suspendiert, dazu 1 Kaffeelöffel Pankreatin und 20 ccm Chloroform. Nach erfolgter Lösung im Brutofen fand sich in der Flüssigkeit colorimetrisch 0,19% Tryptophan. 5 ccm enthalten $\left.\begin{matrix}0{,}0279\\0{,}0278\end{matrix}\right\}$ 0,0276 g N, 100 ccm. 0,552 g N (entsprechend 3,27 g Fibrin), daher Tryptophangehalt des Fibrins 5,9%.

d) Fibrinspaltung mit Barytlauge (s. oben Kapitel II, Versuch c). Aus der Berechnung resultiert ein Tryptophangehalt des Fibrins = 5,2%.

e) 200 g Fibrin (in 2% NaF aufbewahrt) wurde in einem Acetat-Carbonat-Puffergemische mit Trypsin verdaut (vgl. die folgende Arbeit). Aus Colorimetrie und N-Bestimmung resultierte ein Tryptophangehalt des Fibrins = 4,7%.

f) Parallelversuch zu e) ergab einen Tryptophangehalt des Fibrins = 5,1%.

g) Lösung von Fibrin in KOH 30% in der Wärme (s. oben Kapitel II, Versuch e). Es ergab sich ein Tryptophangehalt des Fibrins = 5,1%

h) 620 g frischen feuchten Fibrins (entsprechend 66 g trockenen Fibrins) wurden mit $2^1/_2$ l HCl 0,4% und 5 g Pepsin zur Verdauung angesetzt. Dieselbe wurde nach erfolgtem Zerfalle und Neutralisation in einem Acetat-Puffergemische mit Pankreatin festgesetzt. Es resultierte eine Lösung, die colorimetrisch 3,75 g Tryptophan ergab. Daraus berechnet sich ein Tryptophangehalt des Fibrins = 5,6%.

Es ergab sich also in

Versuch a)	Fibrinlösung	durch	NaOH 10%	ein Tryptophangehalt	= 5,6%
b)	„	„	Pankreatin	„ „	= 5,1%
c)	„	„	„	„ „	= 5,9%
d)	„	„	Barytwasser	„ „	= 5,2%
e)	„	„	Trypsin	„ „	= 4,7%
f)	„	„	„	„ „	= 5,1%
g)	„	„	Pepsin und Pankreatin	„ „	= 5,6%
				Mittelwert	= 5,3%

Bei guter Übereinstimmung der einzelnen Analysen resultiert sonach für das Fibrin ein Mittelwert von 5,3% Tryptophan.

Wir konnten diesen Wert überdies durch die Analyse von Witte-Pepton kontrollieren, welches Präparat aus Fibrin durch weitgehende Pepsinverdauung hergestellt wird:

B. Witte-Pepton.

5 g Witte-Pepton wurden ohne vorhergehende Trocknung in NaOH 20% bei Brutofenwärme im Laufe von 3 Stunden in Lösung gebracht Die Lösung ergab colorimetrisch einen Tryptophangehalt von 0,22% — Kjeldahl

ergab in 5 ccm der Lösung $\left.\begin{matrix}0{,}0306\\0{,}0307\end{matrix}\right\}$ 0,0306 g N — oder 0,612% N. — Eine Probe des Witte-Peptons bei 110° getrocknet, ergab in 0,2 g desselben $\left.\begin{matrix}0{,}0295\\0{,}0291\end{matrix}\right\}$ 0,0293 g N, woraus sich ein N-Gehalt von 14,67% ergibt. Eine Lösung mit 0,612% N entspricht sonach einer 4,17 proz. Witte-Peptonlösung. Diese enthält 0,22% Tryptophan. Daraus resultiert für das Witte-Pepton ein Tryptophangehalt von 5,27%, in genauer Übereinstimmung mit dem vorher für das Fibrin berechneten Mittelwerte von 5,3% Tryptophan.

C. Eieralbumin.

a) $2^1/_2$ g käuflichen Eieralbumins ohne vorhergehende Trocknung in 50 ccm NaOH 10% auf 10° erwärmt. Innerhalb einiger Stunden erfolgte Lösung; 5 ccm desselben enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0277\\0{,}0279\end{matrix}\right\}$ 0,0278 g N, 100 ccm 0,556 g N, was 3,63% Eieralbumin (Ovalbumin mit 15,3% N) entspricht. Auf Grund des colorimetrischen Titers ergab sich für das Eieralbumin ein Gehalt von 2,25%, 2,35%, 2,24%, 2,59%, 2,18%, im Mittel 2,32% Tryptophan.

b) Eieralbumin globulinfrei (Grübler). Durch fraktionierte Salzfällung bereitetes globulinfreies Präparat, koaguliert. Ca. 2 g davon mit 40 ccm NaOH 30% $^1/_4$ Stunde lang am Wasserbade erwärmt: klare Lösung. 5 ccm davon enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0336\\0{,}0336\end{matrix}\right\}$ g N, 100 ccm 0,672 g N, was 4,39% Ovalbumin (mit 15,3% N) entspricht. Colorimetrie ergab 0,125% Tryptophan, für das Eieralbumin berechnet sich demnach ein Gehalt von 2,85% Tryptophan.

Es resultiert für das Eieralbumin ein Mittel von

$$\left.\begin{matrix}2{,}32\\2{,}85\end{matrix}\right\} \;.\;.\; 2{,}58\%\ \text{Tryptophan.}$$

D. Gerinnbares Eiweiß aus dem Muskelplasma des Frosches.

Muskelplasma aus Froschmuskeln durch Extraktion mit phys. NaCl-Lösung bereitet und unter Toluol konserviert, wobei der größte Eiweißanteil spontan in den koagulierten Zustand übergegangen war. Das Plasma wurde am Wasserbade vollends zur Gerinnung gebracht, das Gerinnsel abfiltriert, gewaschen und mit NaOH 30% erwärmt. Innerhalb kurzer Zeit erfolgte vollständige Lösung. Diese gab colorimetrisch 0,045% Tryptophan. 5 ccm der Lösung enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0099\\0{,}0098\end{matrix}\right\}$ 0,0099 g N, 100 ccm 0,198 g N, was (Myogen mit 16,2% gerechnet) 1,22% Eiweiß entspricht. Das Plasmaeiweiß des Frosches würde demzufolge 3,69% Tryptophan enthalten.

E. Globin aus Pferdebluthämoglobin.

In bezug auf die Frage der Beteiligung des Tryptophans am Aufbau des Hämoglobins erwähnt Abderhalden[1]) einen Ver-

[1]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 491 1902

such, wobei 100 g Oxyhämoglobin aus Pferdeblut andauernd der Pankreatinverdauung unterworfen wurden. Die Verdauungsflüssigkeit wurde mit $HgSO_4$ 10% + H_2SO_4 5% ausgefällt. Der zerlegte Niederschlag enthielt, „wie die Tryptophanreaktion mit Brom wasser und die Pyrrolreaktion zeigte, auch Tryptophan".

F. Samuely erwähnt im Biochem. Handlexikon (4, 161, 1911), daß das Globin schwache Adamkiewiczreaktion gibt und nur wenig Tryptophan enthalte.

Versuch a): Wir gingen derart vor, daß Pferdeblut direkt aus der Ader mit $^1/_{20}$ Volumen 1 proz. Kaliumoxalatlösung gemischt und dadurch ungerinnbar gemacht wurde. Das Oxalatplasma trennte sich beim Stehen in der Kälte von den Blutkörperchen gut ab. 50 ccm des Blutkörperchenbreies wurden in 100 ccm Wasser gelöst, die Lösung wurde mit 150 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung ausgefällt und der Niederschlag bei Winterkälte abfiltriert. Sowohl im Filtrate (Fraktion A) als auf dem Filter (Fraktion B) kam es zu einer reichlichen Abscheidung von Hämoglobinkrystallen.

Die globulinhaltige Fraktion B wurde vom Filter genommen, mit Wasser aufgeschwemmt und filtriert und die rote Lösung neuerlich nach vorangegangener Halbsättigung mit Ammonsulfat zur Krystallisation gebracht. Wir erhielten so eine reichliche Abscheidung schön ausgebildeter Krystalle ohne mikroskopisch sichtbare amorphe Beimengungen. Die Krystalle wurden nunmehr abfiltriert, in Wasser gelöst, die rote Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure tropfenweise bis zum Eintritte eines Farbenumschlages in Braun versetzt. Dabei fiel massenhaft ein stark hämatinhaltiger Globulinniederschlag aus. Eine Probe desselben, mit Natronlauge gelöst und entsprechend verdünnt, gab nur eine spurenweise Andeutung der Voisenetreaktion.

Die Krystallfraktion A wurde in Wasser gelöst und die rote Lösung nach Zusatz von etwas Chloroform im Verlaufe von 3 Tagen salzfrei dialysiert. Nunmehr wurde zum Zwecke der Abtrennung des Globins[1]) HCl tropfenweise bis zum Farbenumschlage in Braun zugesetzt, sodann die Abtrennungen des Hämatins durch Ausschüttelung mit Alkoholäther nahezu vollständig durchgeführt. Schon während der Ausschüttelung schied sich das Globin teilweise gallertig ab und wurde durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak vollständig gefällt. Der Niederschlag wurde sodann abfiltriert, gewaschen und in NaOH 5% in der Wärme gelöst. Die so erhaltene Lösung gab nur eine minimale, nichtcolorimetrierbare Voisenetreaktion.

Beachten wir das große Molekulargewicht des Tryptophans (204), so ergibt sich, daß ein Globinmolekül, das unter seinen

[1]) Vgl. diesbezüglich die Vorschriften von F. N. Schulz (Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 454. 1898), W. Hausmann (ebenda 29, 137. 1900) sowie von A. Gamgee und A. Croft-Hill (Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 7. 1904).

regulären Komponenten auch nur ein Molekül Tryptophan enthielte, bei einem Molekulargewicht von ca. 15 000 mehr als 1% Tryptophan enthalten müßte. Nun ist aber das Molekulargewicht des Hämoglobins anscheinend von dieser Größenordnung. Auf Grund des Schwefel-, Eisen- und Hämatingehaltes wurde dasselbe auf etwa 12 000—15 000 bewertet[1]); Jaquet hatte dasselbe auf 16 700 geschätzt; Hüfner und Gansser[2]) ermittelten durch verläßliche direkte osmotische Druckbestimmungen Werte von 15 100—16 300.

Wir werden daher annehmen müssen, daß die sehr geringe Menge Tryptophan in unserer Globinlösung von einer Verunreinigung herrührt.

Versuch b): Bei einem weiteren Versuche wurde Pferdeblutkörperchenbrei in Wasser gelöst, mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt und nur das globulinfreie Filtrat weiter verarbeitet. Über Nacht wurde in diesem eine reichliche Krystallisation von Hämoglobin erhalten. Der Krystallbrei wurde abfiltriert, in Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniak gelöst, mit verdünnter H_2SO neutralisiert und das gleiche Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung hinzugefügt. Die Lösung blieb zunächst klar, um jedoch beim Stehen in der Kälte fast vollständig auszukrystallisieren. In gleicher Weise wurde das Hämoglobin noch zweimal umkrystallisiert.

Die schließlich erhaltenen Krystalle, die noch immer Spuren von Tryptophan in ihrem Eiweiß einschlossen, wurden, wie im vorigen Versuche, auf Globin weiter verarbeitet. Die wässerige Lösung, nach Beseitigung des Hämatins vorsichtig mit Ammoniak gefällt, gab einen Niederschlag. Dieser abfiltriert und in starker Natronlauge gelöst, gab überhaupt keine Voisenetreaktion mehr.

Wir werden also annehmen dürfen, daß das Hämoglobin ein tryptophanfreier Eiweißkörper sei und daß jene geringen Tryptophanmengen, die sich darin nachweisen ließen, nicht dem roten Blutfarbstoffe als solchem, vielmehr bei der Krystallisation eingeschlossenem und nur schwer völlig abtrennbarem Serumeiweiß angehören.

F. Thymushiston.

Das trockene Präparat wurde in NaOH 20% unter Erwärmen größtenteils gelöst und die Lösung filtriert. 5 ccm desselben enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0259\\0{,}0258\end{matrix}\right\}$ g N,

[1]) Vgl. Fr. N. Schulz, Die Größe des Eiweißmoleküles. Jena 1903 Gustav Fischer.

[2]) G. Hüfner und E. Gansser (Tübingen), Arch. f. Anat. u. Physiol. 1907, 209.

100 ccm 0,518 g N, was 2,82% Histon (mit einem N-Gehalte von 18,3%) entspricht. Colorimetrie: 0,03% Tryptophan. Das Präparat hat demnach 1,06% Tryptophan enthalten.

G. Edestin.

Von einem aus Hanfsamen gewonnenen krystallisierten Präparate wurde $^1/_2$ g in 10 ccm NaOH 20% bei Brutofenwärme schnell gelöst. Die Lösung enthielt 0,795% N, was 4,25% Edestin (mit 18,7% N) entspricht. Colorimetrie ergab für das Präparat einen Tryptophangehalt von etwa 3%

H. Keratin aus Hornspänen.

Hornspäne wurden mit NaOH 20% einige Stunden im Brutofen, sodann am Wasserbade digeriert, wobei größtenteils Lösung eintrat. Es wurde durch ein gehärtetes Filter filtriert. Die Lösung enthielt in 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0273\\0{,}0273\end{matrix}\right\}$ g N, in 100 ccm 0,546 g N, was 3,6% Keratin (mit 15% N) entspricht. Colorimetrie: 0,043% Tryptophan. Demnach enthielt das Keratin 1,19% Tryptophan.

I. Conchiolin.

Aus Schalen von Pinna gewonnen (Präparat von Wetzel). 2 g davon fein gepulvert, mit 40 ccm NaOH 30% verrieben und ca. $^1/_4$ Stunde am siedenden Wasserbade erhitzt, filtriert. 5 ccm der Lösung: $\left.\begin{matrix}0{,}022\\0{,}022\end{matrix}\right\}$ g N, 100 ccm: 0,44 g N, was 2,64% Conchiolin (mit 16,6% N)[1]) entspricht. Coloriemetrie: 0,07% Tryptophan. Conchiolin hat demnach einen Gehalt von 2,65% Tryptophan ergeben.

K. Gelatine,

L. Seidenfibroin,

M. Elastin

gaben bei analogen Versuchen entweder gar keine oder nur äußerst schwache, offenbar von Verunreinigungen herrührende Voisenetreaktion.

Wir stellen nun die aus dieser und der vorangehenden Arbeit sich für den Tryptophangehalt verschiedener Proteine ergebenden Mittelzahlen tabellarisch zusammen und setzen die Resultate anderer Autoren zum Vergleiche daneben (S. 146).

Wir ersehen aus dieser Tabelle, daß die von uns gefundenen Zahlen erheblich, sehr oft um ein Vielfaches größer sind als die von früheren Autoren mit anderen Methoden gefundenen Werte.

---

[1]) Nach Wetzel, Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 288. 1900.

Tabelle I.

Tryptophangehalt einiger Proteine.

	Fürth, Lieben u. Nobel	Herzfeld	Sanders u. May	E. u. H. Salkowski	Annie Homer	Fasal
	%	%	%	%	%	%
Serumalbumin (Pferd)	1,3	0,95	—	—	—	—
Serumglobulin	4,4	—	—	—	—	—
Fibrin	5,3	—	—	2,21	—	—
Hämoglobin	θ	—	—	—	—	—
Casein aus Kuhmilch	2,2	0,51	1,6	—	{0,99 1,59}	0,65
Lactalbumin	2,9	—	—	—	—	3,07
Frauenmilcheiweiß . .	6,3	—	—	—	—	—
Eieralbumin	2,6	0,52	—	—	—	—
Muskelplasmaeiweiß (Frosch).	3,7	—	—	—	—	—
Thymushiston	1,1	—	—	—	—	—
Elastin	θ	0,22	—	—	—	—
Keratin	1,2	—	—	—	—	0,20—0,5
Conchiolin.	2,6	—	—	—	—	—
Edestin	3,0	—	—	—	—	0,38
Wittepepton	5,3	—	—	—	—	—
Gelatine.	θ	—	—	—	—	—
Seidenfibroin	θ	—	—	—	—	—

Wir haben, vorläufig wenigstens, keinen Grund anzunehmen, daß das Molekulargewicht typischer Eiweißsubstanzen die Größenordnung von 15 000—20 000 wirklich wesentlich überschreite; wahrscheinlich halten sich Eiweißkörper im allgemeinen unter dieser Grenze[1]).

Es scheint uns nun beachtenswert, daß unsere Analysen, insoweit sie überhaupt einen Tryptophangehalt eines Eiweißkörpers nicht gänzlich vermissen ließen, einen solchen von mindestens 1% oder darüber ergaben (vgl. das Serumalbumin, Thymushiston und Keratin mit Werten zwischen 1,1 und 1,3%). Da das Molekulargewicht des Tryptophans 204 beträgt, müßte ein Eiweißkörper mit dem Molekulargewichte von 20 000, falls er nur ein Molekül Tryptophan in seinem Verbande einschließt, 1% Tryptophan, ein solcher mit dem Mol.-Gew. 15 000 1,3% Tryptophan, ein solcher mit dem Mol.-Gew. 10 000 aber 2% enthalten.

[1]) Vgl. O. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper. 3. Aufl. 1911, S. 170ff. und E. Abderhalden, Lehrb. d. physiol. Chemie. I. Teil, 3. Aufl. 1914, S. 388

Wir sind weit davon entfernt, unsere Werte als definitive Standardzahlen zu betrachten; vielmehr wird durch weitere und viel zahlreichere Analysen eine Korrektur derselben zweifellos zu gewärtigen sein, um so mehr als manche dieser Analysen aus einer Zeit stammen, wo wir die zahlreichen Fehlerquellen noch nicht so gut gekannt haben, wie dies gegenwärtig der Fall ist. Zur Orientierung mögen sie aber jedenfalls genügen und glauben wir immerhin, der Wahrheit wesentlich näher gekommen zu sein als unsere Vorgänger.

IV. Tryptophangehalt menschlicher Organe.

Wir haben es schließlich versucht, uns durch eine Reihe von Beobachtungen über den Tryptophangehalt normaler menschlicher Organe wenigstens einigermaßen zu orientieren. Für die Beistellung des Materiales sind wir dem Vorstand der Lehrkanzel für gerichtliche Medizin, Herrn Prof. Dr. Albin Haberda, sowie den Assistenten dieses Institutes zu besonderem Danke verpflichtet.

Wir gingen im allgemeinen derart vor, daß wir 10 g des feingekochten Organes mit 50 ccm KOH 30% in einem Kölbchen bis zu erfolgter, nahezu vollständiger Lösung[1]) am Wasserbade erwärmten (was meist $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden in Anspruch nahm). Sodann wurde das Volumen kontrolliert, durch ein gehärtetes Filter filtriert und mit 2 ccm der alkalischen Lösung direkt die Voisenetreaktion angesetzt.

Hatten wir so den Tryptophangehalt des gesamten Organes ermittelt, so gingen wir, um überdies den Tryptophangehalt der Gesamtheit des Organproteins zu ermitteln, derart vor, daß ein anderer Anteil des Organbreies 3 mal mit Wasser ausgekocht wurde. Vom abgepreßten Koagulum wurden etwa 5 g in 25 ccm KOH 30% durch Erwärmen am Wasserbade gelöst. In der filtrierten Lösung wurde einerseits der Tryptophangehalt, andererseits aber der N-Gehalt durch

[1]) Allzu lang festgesetztes Erwärmen erwies sich als unzweckmäßig So ergab eine derartige alkalische Organlösung:

	Muskel	Herz	
nach 1 Stunde Erwärmen	0,28%	0,40%	Tryptophan
„ $2^1/_2$ Stunden „	0,25%	0,33%	„
„ 6 „ „	0,25%	0,25%	„

Doppelbestimmung ermittelt und das N auf Eiweiß (mit rund 16% N) umgerechnet.

Beispiel: Herzmuskel.

a) Das Organ enthielt 0,40% Tryptophan.

b) Organbrei auskoaguliert, 5 g Koagulum in 25 ccm KOH 30% gelöst. Lösung enthielt 0,14% Tryptophan.

3 ccm derselben enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0207\\0{,}0210\end{matrix}\right\}$ 0,0208 g N

oder

100 ccm 0,69 g N, was 4,31% Eiweiß (mit 16% N) entspricht.

Daher enthält Herzmuskeleiweiß 3,25% Tryptophan.

Gelegentlich haben wir diesen Vorgang auch derart modifiziert, daß wir das Koagulum auf einem gehärteten Filter sammelten, vom Filter in eine Glasschale übertrugen, bis 110° trockneten, zur Wägung brachten und dann erst in Lauge lösten.

Wir stellen unsere Resultate in 2 Tabellen zusammen:

Wir möchten diese Zahlen nur als zur ungefähren Orientierung geeignet hingestellt haben, nicht aber etwa als definitive Standardzahlen. Streng genommen können alle diese Werte nur als Minimalwerte gelten. Denn wir können es kaum mit Sicherheit

Tabelle II.

Tryptophangehalt der Organe	I. Älterer Mann m. chron. Nephritis, plötzl. Exitus %	II. 46 jährige Frau, Exitus durch Herzschlag %	III. 24 jähriger kräftiger Mann, Selbstmord d. Lungenschuß %	IV. 32 jährige Frau, Selbstmord d. Herzschuß %	V. 54 jähriger Mann, Exitus d. Herzschlag %	VI. 40 jähriger Mann, plötzl. Exitus %	VII. 33 jähriger Mann, plötzl. Exitus d. Herzschlag %	VIII. 54 jährige Frau, plötzl. Exitus d. Herzschlag %	IX. Verschiedene Individuen %	Mittelwert
Skelettmuskel	0,28	0,38					0,31		0,33	0.32
Herz	0,40	0,28	0,27	0,28		0,78	0,41	0,40		0,35
Leber	0,60	0.48	0,62	0,52						0,57
Milz	0,60	0,41	0,55	0,59		0,81		0,54		0,58
Niere	0,25	0,46	0,39	0,36		0,58	0,40			0,41
Pankreas	0,27		0,25							0,26
Lunge	0,42	0,33	0,35	0,48						0,39
Magen		0,25	0,25							0,25
Dünndarm		0,23								0,23
Dickdarm					0,21					0,21
Thymus									0,22	0,22
Hirn	0,13	0,21			0,16					0,13
Schilddrüse			0,32			0,74			0,59 0,35 0,43 0,76	0,53
Hoden					0,28	0,12	0,20			0,20
Ovarium				0,29				0,18		0,24

Tabelle III.

Tryptophangehalt der Organeiweißkörper	I. %	II. %	III. %	IV. %	V. %	VI. %	VII. %	VIII. %	IX. %	Mittelwert
Skelettmuskel . .	2,60	2,55					2,00		1,90	2,25
Herz	3,25	2,14	2,80	2,08				2,50		2,55
Leber	4,80	3,63	4,07	2,91		2,80				3,64
Milz	4,70	3,60	3,47			3,06	3,19			3,60
Niere	2,38		4,00	2,20		2,10	3,20			2,78
Lunge	4,84	2,41		3,44						3,58
Pankreas.	4,55		3,00							3,77
Magen		2,70	2,10							2,40
Dünndarm		1,75								1,75
Dickdarm					1,54					1,54
Hirn	2,17	1,34			1,46					1,66
Schilddrüse . . .			2,34		1,80	2,21			3,66 } 2,10 }	2,67
Hoden					2,29	2,33	1,70		2,65 } 3,92 }	2,11

ausschließen, ob nicht z. B. beim Erwärmen der Organe mit starker Lauge sich oxydative Nebenreaktionen im Sinne einer Tryptophanzerstörung geltend machen. Daß unter verschiedensten physiologischen und pathologischen Bedingungen der Tryptophangehalt der Organe vom Blutgehalte, dem Durchfeuchtungsgrade, von größerem oder kleinerem Reichtum an Bindegewebe, von dem relativen Verhältnis tryptophanreicher und tryptophanarmer Proteine im Protoplasma und auch von vielen anderen Faktoren abhängig sein muß, liegt auf der Hand, und es wird Aufgabe weiterer und eingehenderer Untersuchungen sein müssen, unser Wissen über diesen Gegenstand fest zu fundieren.

Es unterliegt aber wohl keinem Zweifel, daß wir, wenn wir z. B. der Niere einen mittleren Tryptophangehalt von 0,4% zuschreiben, der Wahrheit weit näher kommen dürften als Elisabeth Kurchin[1]), die bei der Tryptophanbestimmung in Nieren nach der Methode von Herzfeld für ein Organ von 300 g einen Mittelwert von 0,26 g Tryptophan, i. e. 0,02%, ermittelt hat; d. i. nur ein Zwanzigstel unseres Mittelwertes.

Auch gestatten uns unsere Zahlen immerhin, uns ein ungefähres Bild von der Tryptophanverteilung und dem Tryptophangehalte im ausgewachsenen menschlichen Körper zu machen.

[1]) l. c

Auf Grund der Vierordtschen Zahlen[1]) und unserer Tryptophanmittelwerte ergibt sich für ein Individuum von $58^1/_2$ kg Körpergewicht

ein	Gewicht	von	28,7	kg	Muskulatur	mit	einem	Gehalte	von	91,8	g	Tryptophan
„	„	„	0,3	„	Herz	„	„	„	„	1,0	„	„
„	„	„	1,8	„	Leber	„	„	„	„	10,2	„	„
„	„	„	0,16	„	Milz	„	„	„	„	0,9	„	„
„	„	„	0,30	„	Niere	„	„	„	„	1,2	„	„
„	„	„	0,10	„	Pankreas	„	„	„	„	0,8	„	„
„	„	„	0,99	„	Lunge	„	„	„	„	3,9	„	„
„	„	„	1,36	„	Magen-Darm	„	„	„	„	3,4	„	„
„	„	„	1,48	„	Gehirn	„	„	„	„	1,3	„	„
„	„	„	0,03	„	Thymus	„	„	„	„	0,06	„	„
„	„	„	0,03	„	Schilddrüse	„	„	„	„	0,15	„	„
„	„	„	0,05	„	Hoden	„	„	„	„	0,10	„	„
„	„	„	11,5	„	Skelett	„	„	„	„	0?	„	„
„	„	„	11,7	„	Haut und Unterhautgewebe	„		„	„	0?	„	„
		Kilo	58,50							114,8	g	Tryptophan

Wir berechnen sonach für ein Individuum von $58^1/_2$ kg Körpergewicht einen Gesamttryptophangehalt von etwa 115 g Tryptophan, d. i. etwa 0,2%. Von dem gesamten im Körper enthaltenen Tryptophan dürften rund etwa $^8/_{10}$ auf die Muskulatur, etwa $^1/_{10}$ auf die Leber und das restliche $^1/_{10}$ auf alle übrigen Organe zusammen entfallen.

Zusammenfassung.

1. Die Voisenetsche Reaktion wurde vom Gesichtspunkte einer Verwertung derselben für den Zweck einer colorimetrischen Tryptophanbestimmung methodisch durchgearbeitet u. zw in bezug auf Spezifität, Empfindlichkeit, zeitlichen Ablauf, Einfluß des Verdünnungsgrades, des Formol- und Nitritzusatzes, der Salzsäurekonzentration, der störenden Wirkung oxydativer und reduktiver Faktoren, der Spontanabscheidung des Farbstoffes, der Herstellung haltbarer Standardlösungen sowie endlich auch in bezug auf das Absorptionsverhältnis bei spektrophotometrischer Beobachtung (Dr. Charnas).

2. Aus diesen Beobachtungen resultiert, daß die Reaktion mit tryptophanhaltigen Lösungen zweckmäßigerweise in folgender Art angestellt wird: 2 ccm der Flüssigkeit werden mit einem Tropfen 2 proz. Formaldehydlösung und mit ca. 15 ccm möglichst konzentrierter reiner Salzsäure gemischt. Erst nach

[1]) H. Vierordt, Anatom.-physiol. u. physikal. Tabellen, 3. Aufl. 1906. S. 44.

ca. 10 Min. fügt man 10—12 Tropfen (wenn erforderlich aber mehr) einer 0,05 proz. Natriumnitritlösung hinzu, mischt und füllt mit konz. HCl auf 20 ccm auf. Schon nach kurzer Zeit kann die Intensität der eingetretenen Violettfärbung mit derjenigen einer in ganz analoger Weise aus einer 0,1 proz. Tryptophanlösung berechneten Standardlösung colorimetrisch mit Hilfe eines Dubosq-Colorimeters verglichen werden. (Die Anwendung ganz aus Glas angefertigter Tröge ist unerläßlich.)

3. Die Überprüfung der Methode durch Tryptophanbestimmung in verschieden konzentrierten Lösungen sowie auch durch Tryptophanzusatz zu Gelatinelösungen ergab insoweit befriedigende Resultate, als die Fehler 20% nicht überschritten und sich meist um 10% herum bewegt haben.

4. Auch in schwerlöslichen und koagulierten Proteinen ist die direkte Bestimmung des Tryptophans ohne vorherige Abspaltung desselben aus der Eiweißbindung (dank der relativen Resistenz des Tryptophans gegenüber der Alkalieinwirkung) möglich. Wofern man es nicht vorzieht, die Aufschließung auf dem Wege der Verdauung zu bewerkstelligen, bringt man das Protein durch eine (nicht länger als nötig fortgesetzte) Einwirkung von 20—30 proz. Alkalilauge am Wasserbade in Lösung. Mit 2 ccm einer derartigen Lösung stellt man dann die Voisenetreaktion in typischer Weise an.

5. Der Tryptophangehalt der bisher untersuchten Proteine erwies sich durchweg erheblich (sehr oft um ein Vielfaches) größer, als den von früheren Autoren mit anderen Methoden ermittelten Werten entspricht. Durch einen besonders hohen Tryptophangehalt zeichnet sich das Fibrin (5,3%), ebenso wie das aus demselben hergestellte Wittepepton (5,3%) aus. Das Serumglobulin (4,0%) wurde um ein Mehrfaches tryptophanreicher als das Serumalbumin (1,3%) gefunden; das Hämoglobin ist allem Anscheine nach tryptophanfrei. Das Frauenmilcheiweiß (6,3%) wurde um ein Mehrfaches tryptophanreicher gefunden als das Casein aus Kuhmilch (2%). Auf einer mittleren Breite von 2—3½% bewegt sich der Tryptophangehalt des Eieralbumins, Edestins, Conchiolins, der Eiweißkörper des Muskels sowie anscheinend der meisten Organeiweißkörper des Menschen. Das Keratin (1,2%) sowie das Thymushiston (1,0%) erscheint tryptophanarm, die Gelatine, das

Elastin und das Fibrin als tryptophanfrei. (Die angegebenen Zahlen sollen einstweilen nur als vorläufige Orientierungswerte gelten und bedürfen der Korrektur durch weitere Untersuchungen.)

6. Der Tryptophangehalt normaler menschlicher Organe liegt zwischen 0,1—0,6%. Als besonders tryptophanreich (0,5—0,6%) erwies sich Leber, Milz und Schilddrüse, als besonders tryptophanarm das Hirn. Der Gehalt der anderen Organe beträgt 0,2—0,4%. Auf Grund unserer Mittelzahlen sowie der Vierordtschen Tabellen kann der Tryptophangehalt eines Individuums von 58½ kg auf etwa 115 g geschätzt werden (i. e. etwa 0,2%). Davon entfallen etwa $^8/_{10}$ auf die Muskulatur, $^1/_{10}$ auf die Leber und nur das restliche Zehntel auf die Summe aller anderen Organe.

Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan. III.

Über die Abspaltung des Tryptophans beim Verdauungsvorgange.

Von

Otto Fürth und **Fritz Lieben.**

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Universitätsinstitutes Ausgeführt mit Unterstützung der Bernhard-Wetzler-Stiftung für Volksernährung).

(Eingegangen am 12. Juni 1920.)

1. Fragestellung.

Die Ausarbeitung einer Methode, das Tryptophan mit einiger Genauigkeit quantitativ bestimmen zu können, hat auch die Möglichkeit erschlossen, diese für den Ernährungsvorgang besonders wichtige Komponente des Eiweißmoleküles in den einzelnen Phasen des Verdauungsvorganges verfolgen zu können.

Wie bekannt, vermag das Pepsin das Tryptophan nicht in Freiheit zu setzen. Dasselbe wird vielmehr erst durch die Wirkung des tryptischen Fermentes aus dem Verbande des Proteinmoleküles herausgeschält.

Nun vollzieht sich aber die Ausschälung der einzelnen Aminosäuren aus dem Riesenkomplexe des Eiweißmoleküles, wie wir insbesondere dank den Untersuchungen E. Fischers und Abderhaldens wissen, durchaus nicht in gleichmäßiger Weise.

„Trotz der in manchen Punkten verschiedenen Resultate", sagt Abderhalden[1]), „läßt sich als eindeutig gesichertes Resultat anführen, daß durch Pankreassaft bestimmte Aminosäuren sehr frühzeitig vollständig aus Eiweiß abgespalten werden, während andere Bausteine langsam folgen und manche sich als nicht aus ihrer Bindung loslösbar erweisen." ... Ferner: „Zahlreiche Versuche ergaben übereinstimmend, daß die einzelnen Aminosäuren verschieden rasch abgespalten werden. Tyrosin, Tryptophan und Cystin erscheinen sehr bald in der Verdauungsflüssigkeit Das Tyrosin zeigt sich selbst an, wenn es in

[1]) E. Abderhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3. Aufl I. Teil, S. 483—485 1914.

Freiheit gesetzt worden ist. Es krystallisiert infolge seiner Schwerlöslichkeit selbst aus. Das Tryptophan läßt sich mittels der Bromwasserreaktion nachweisen. Nur die freie Aminosäure gibt eine rosarote Färbung. Solange das Tryptophan mit anderen Aminosäuren verbunden ist, fällt die Bromwasserreaktion mit dem Verdauungsgemisch negativ aus. Seine Abspaltung erkennt man am Auftreten der typischen Reaktion...

... Beispiele zeigen, daß z. B. Tyrosin und Glutaminsäure durch Pankreassaft sehr verschieden rasch aus Eiweiß abgespalten werden. Während die erstere Aminosäure schon nach kurzer Zeit in ihrer ganzen Menge in freiem Zustand in der Verdauungsflüssigkeit vorhanden ist, wird Glutaminsäure ganz allmählich abgespalten... Gleichzeitig lassen sich auch andere Aminosäuren, wie Alanin, Valin, Leuzin, Asparaginsäure, Lysin, Arginin und Histidin in der Verdauungsflüssigkeit nachweisen. Vermißt werden meist vollständig Prolin und Phenylalanin."

Wir haben nun die Möglichkeit, das Tryptophan quantitativ zu bestimmen, dazu benutzt, um festzustellen, ob die Vorstellung, welche dem Tryptophan neben dem Tyrosin und Cystin sozusagen eine besonders exponierte Stellung im Eiweißmoleküle zuweist, wirklich zutreffend sei.

Die Frage erscheint, abgesehen von ihrem theoretischen Interesse, auch für die praktische Frage der Darstellung und Gewinnung des Tryptophans von Wichtigkeit. Sind wir ja doch diesbezüglich, da die Abspaltung freien Tryptophans aus dem Verbande des Eiweißmoleküles weder durch Säuren noch durch Alkalihydrolyse praktikabel ist, ganz auf die tryptische Verdauung angewiesen.

Wir sind daher daran gegangen, die Tryptophanabspaltung beim Verdauungsvorgange messend zu verfolgen.

2. Methodisches.

Als brauchbarer und bequemer Maßstab für das Fortschreiten des Verdauungsvorganges hat sich uns die Formoltitration nach Sörensen erwiesen, welche uns in jeder Phase darüber Auskunft zu geben vermochte, ein wie großer Bruchteil des Gesamt-N bereits in Form von Aminosäuren in Freiheit gesetzt worden sei.

Es kam für uns nun zunächst darauf an, ein Mittel ausfindig zu machen, um freies und in Polypeptidform gebundenes Tryptophan mit ausreichender Sicherheit unterscheiden zu können. Schließlich hat sich uns der Weg der Phosphorwolframsäurefällung als gangbar erwiesen.

Das Verhalten des Tryptophans der Phosphorwolframsäure gegenüber bedarf einer Klarstellung, da die Meinungen darüber anscheinend auseinandergehen. So basiert das Bestimmungsverfahren von Annie Homer[1]) auf der Annahme, daß das freie Tryptophan von begleitenden Polypeptiden durch PWS-Fällung glatt gesondert werden kann. Dagegen betont van Slyke die Fällbarkeit des Tryptophans durch PWS[2]). Tatsächlich verhält sich die Sache folgendermaßen:

Eine 1 proz. Tryptophanlösung (in $^{n}/_{20}$-HCl) gab mit frischbereiteter 10 proz. PWS. (Kahlbaum) eine voluminöse Fällung, die in viel Wasser, sowie auch bei Zusatz von etwas 10 proz. Salzsäure klar löslich war. Wurde die 1 proz. Tryptophanlösung direkt stark mit Salzsäure angesäuert, so gab PWS. keine direkte Fällung.

Eine 0,1 proz. und eine 0,05 proz. Tryptophanlösung gab (ohne Säurezusatz) mit PWS. erst nach längerem Stehen eine voluminöse Fällung.

Eine 0,5 proz. Tryptophanlösung (in NaF 2%) gab mit HCl stark angesäuert mit PWS. 10% keine Fällung.

In einer stark verdünnten und überdies mit HCl stark angesäuerten Tryptophanlösung ist also, wenn man, ohne lange stehen zu lassen, filtriert, ein Verlust infolge PWS-Fällung tatsächlich nicht zu befürchten.

Wir haben uns überdies durch Zusatz abgewogener Tryptophanmengen zu Verdauungsflüssigkeiten davon überzeugt, daß keine wesentliche Menge freien Tryptophans durch Fällung der Kolloide mit PWS verloren ging.

a) 100 ccm eines Verdauungsgemisches (Trypsinverdauung von Fibrin in Phosphatpuffermischung s. unten), enthaltend 0,04 g freies Tryptophan, wurde mit 0,056 g reinen Tryptophans, gelöst in ein wenig HCl, versetzt. Nach vollständiger Ausfällung mit PWS. fand sich colorimetrisch im Filtrate 0,092 g Tryptophan (statt $0{,}04 + 0{,}056 = 0{,}096$ g); also praktisch kein Verlust.

b) Zu 100 ccm des gleichen Verdauungsgemisches (enthaltend 0,040 g freies Tryptophan) wurden 40 ccm Gelatine 1% und 0,53 g Tryptophan, gelöst in wenig HCl, hinzugefügt. Im Filtrate der Phosphorwolframsäurefällung resultierte 0.080 g Tryptophan (statt $0{,}040 + 0{,}053 = 0{,}093$ g).

Man kann sonach darauf rechnen, bei Phosphorwolframsäurefällung stark angesäuerter pankreatischer Verdauungsflüssigkeiten keine wesentlichen Tryptophanverluste zu erleiden.

---

[1]) l. c.; vgl. die erste der vorausgehenden Abhandlungen.

[2]) J. D. van Slyke, Journ. biol. Chem. 10, 39. 1911: „Tryptophan is known to be precipitated partially with phosphotungstic acid, even from fairly dilute solutions."

Es sei aber ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich dies nicht etwa auf Kolloide im allgemeinen übertragen läßt. Sind hochmolekulare Kolloide neben wenig Tryptophan in großem Überschusse vorhanden, so wird, wie uns Versuche mit Blutserum und Gelatine gelehrt haben, das freie Tryptophan mit dem voluminösen PWS-Niederschlage zum großen Teile mitgerissen. Pankreatische Verdauungsflüssigkeiten jedoch in fortgeschrittenen Stadien der Verdauung, die nur mehr wenig „Albumosen" und hauptsächlich „Peptone" neben relativ viel Tryptophan enthalten, verhalten sich diesbezüglich eben ganz anders als z. B. Blutserum, dem man eine kleine Menge freien Tryptophans zugesetzt hat.

3. Trypsinverdauung von Fibrin.

1. Versuch: Unter Alkohol aufbewahrtes Fibrin wurde abgepreßt, in Na_2CO_3 0,5% suspendiert, mit Pankreatin unter Chloroformzugabe im Brutofen zur Verdauung angesetzt. Im Laufe einiger Tage erfolgte fast vollständige Lösung. Eine Probe gab mit Bromwasser intensive Rotfärbung. Kjeldahl ergab 0,298% N, was 1,76% Fibrin (mit 16,9% N) entspricht. Die Colorimetrie ergab 0,09% Tryptophan (was für das Fibrin einem Tryptophangehalte von 5,1% gleichkommt). Die Flüssigkeit wurde nunmehr durch Zusatz von konz. H_2SO_4 auf ca. 4% davon gebracht und mit einer 10proz. $HgSO_4$-Lösung in H_2SO_4 5% ausgefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff sorgfältig zerlegt, dieser durch einen Luftstrom vertrieben. Die Colorimetrie ergab nunmehr, daß diese Fraktion nur ca. $^1/_3$ der ursprünglich vorhandenen Tryptophanmenge enthielt.

Es war also nur etwa ein Drittel der im Fibrin vorhandenen Tryptophanmenge in eine durch das Hopkinsche Reagens fällbare Form übergegangen.

2. Versuch: $^1/_4$ kg frischen, ausgewaschenen Fibrins wurde in 1 l Na_2CO_3 0,5% mit etwas Chloroform und 1 Kaffeelöffel Pankreatin im Brutofen zur Verdauung angesetzt. Schon am nächsten Tage war das Fibrin völlig zerfallen und bis auf geringe Reste zu einer trüben Lösung umgewandelt 5 ccm desselben enthielten $\left.\begin{matrix}0{,}0279\\0{,}0273\end{matrix}\right\}$ 0,0276 g N, 100 ccm 0,552 g N, was 32,7 g Fibrin (mit 16,9% N) in der gesamten Verdauungsflüssigkeit (1 l) entspricht. Die Colorimetrie ergab einen Gesamtgehalt von 1,9 g Tryptophan (was einem Tryptophangehalt des Fibrins = 5,9% entsprechen würde). Nach 3 Tagen wurde mit Essigsäure neutralisiert und dabei ein unverdauter Eiweißanteil mit einem Gehalte von 0,21 g Tryptophan gefällt. In dem klaren Filtrate fand sich 1,62 g Tryptophan in gelöster Form (die Lösung gab intensive Biuretreaktion und mit PWS. einen massenhaften Niederschlag, war jedoch durch Sättigung mit Aminosulfat nicht mehr fällbar, enthält also keine „Albumosen" mehr, sondern nur „Peptone".

Zum Zwecke der Isolierung des Tryptophans wurde, dem Verfahren Neubergs[1]) folgend, mit $HgSO_4$ in schwefelsaurer Lösung gefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit H_2S zerlegt, dieser vertrieben, das klare gelbe Filtrat mit einem Überschusse von Bleioxyd erwärmt, ein wenig NH_3 hinzugefügt, aufgekocht, entbleit und das Filtrat schließlich zum Sirup eingeengt, wobei eine Krystallisation von Tryptophan in Form tafelförmiger, zu Drusen angeordneter Blättchen erhalten wurde, die mit Hilfe der Zentrifuge von der Mutterlauge abgetrennt werden konnten. Die Ausbeute (wenige Dezigramm) entsprach nur einem Bruchteile des in dem verarbeiteten Fibrin enthaltenen Tryptophanquantums.

3. Versuch: Fibrinverdauung in Phosphat-Puffermischung. 300 g unter Alkohol aufbewahrten Fibrins (abgepreßt, einem Trockengehalte von ca. 70 g trocknen Fibrins mit ca. 3,5 g Tryptophan entsprechend) wurde in einem dem Optimum der Trypsinwirkung entsprechenden Phosphatgemische[2]) (350 ccm Na_2HPO_4 $^n/_{15}$ + 150 ccm KH_2PO_4 $^n/_{15}$ + 500 ccm H_2O) mit 3 g Grüblerschen Trypsins und etwas Xylol im Brutofen zur Verdauung angesetzt. In den einzelnen Phasen wurde eine Probe entnommen, bei stark salzsaurer Reaktion mit einem Überschusse von PWS. ausgefällt, diese aus dem Filtrate mit Baryt und der Barytüberschuß mit CO_2 beseitigt. Schließlich wurde eingeengt, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und colorimetriert.

Nach 2 tägiger Verdauung fand sich so im PWS-Filtrate nur 0,3 g Tryptophan
„ 5 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,80 g „
„ 9 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,77 g „

Eine Portion der Verdauungsflüssigkeit wurde nun im Brutofen in einem Pergamentschlauche der Dialyse unterworfen, um die hemmende

[1]) C. Neuberg, Charité-Annalen 30. 1906.

[2]) Nach Oppenheimer (Fermente, 4. Aufl. 1913, S. 452) liegt das Optimum der Trypsinwirkung für die Peptonspaltung bei einer schwach alkalischen Reaktion, etwa $H^+ = 10^{-8}$ entsprechend. Es ist dies die Reaktion einer noch freie CO_2 enthaltenden Lösung von $NaHCO_3$. Nach L. Michaelis und H. Davidsohn (Biochem. Zeitschr. 38, 280. 1911) liegt das Optimum bei $H^+ = 2 \cdot 10^{-8}$. Die Wirksamkeit ändert sich zwischen 10^{-7} und 10^{-9} äußerst wenig; dann sinkt sie rapide, so daß sie von 10^{-5} einerseits und von 10^{-11} andererseits an = 0 gesetzt werden kann. Nach J. H. Long und Mary Hull (Journ. Amer. Chem. Soc. 39, 1051, Chem. Centralblatt 1917, II, 633) ergaben Versuche mit Phosphatgemischen (KH_2PO_4 + K_2HPO_4) unter Kontrolle der H-Ionenkonzentration mit Gasketten für Fibrinverdauung ein Optimum $H^+ = 10^{-8}$ bis $5 \cdot 10^{-9}$, für Caseinverdauung ein Optimum von $H^+ = 3 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-7}$. — Nach P. Rona (Abderhaldens Arbeitsmeth. 5, 1096) entspricht obiges Phosphatgemenge (7 ccm Na_2HPO_4 $^n/_{15}$ + 3 ccm KH_2PO_4 $^n/_{15}$) $p_H = 7 \cdot 146$.

Wirkung der Verdauungsprodukte zu beseitigen. Im Dialysate fand sich (auf die Gesamtmenge der Flüssigkeit umgerechnet) 0,52 g freien Tryptophans.

Eine andere Portion des Verdauungsgemisches wurde mit 30proz Natronlauge 8 Stunden im Wasserbade erwärmt. Es resultierte, auf die Gesamtmenge der Flüssigkeit umgerechnet, 0,82 g freies Tryptophan.

Schließlich versuchten wir noch, „Erepsin" in Aktion zu bringen: die ganze Darmschleimhaut eines 23jährigen Selbstmörders wurde abgeschabt und in 150 ccm eines Phosphatgemisches (s. oben) suspendiert und einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde coliert und die trübe Flüssigkeit dem Verdauungsgemische hinzugefügt. Nach 2 Tagen im Brutofen fand sich (auf die Gesamtmenge bezogen) 0,90 g freies Tryptophan.

Von der im Fibrin enthaltenen Gesamtmenge (ca. 3,5 g Tryptophan) war also nach 5 Tagen im Brutofen ca. ein Viertel in der freien, durch PWS nicht mehr fällbaren Form abgespalten worden. Es ist weden durch Mehrzusatz von Ferment, noch durch Dialyse, noch durch Hydrolyse mit starker Lauge, noch aber durch „Erepsin" gelungen, eine bessere Ausbeute zu erzielen.

4. Versuch: Kombination von Pepsin, Trypsin und Erepsin. 125 g feuchten Fibrins wurden mit 500 ccm HCl 0,4% und 5 g Pepsinum germanicum unter Xylolzusatz im Brutofen angesetzt; nach 2 Tagen ist fast vollständige Lösung erfolgt. Nunmehr wurde mit Natronlauge gegen Lakmuspapier neutralisiert, das gleiche Volumen eines Phosphatpuffergemisches (aus gleichen Teilen KH_2PO_4 $^n/_{15}$ und Na_2HPO_4 $^n/_{15}$ zusammengesetzt) und 5 g Trypsin Grübler, später noch 2 g Pankreatin Rhenania hinzugefügt. Nach dreitägiger Einwirkung war, wie eine nach dem PWS.-Barytverfahren verarbeitete Probe lehrte, erst sehr wenig Tryptophan in Freiheit gesetzt. — Es wurde nun „Erepsin"einwirkung versucht: Menschliche Dünndarmschleimhaut wurde möglichst fein zerkleinert, mehrere Tage lang mit einem Puffergemische bei Zimmertemperatur (s. oben) digeriert, koliert und die Flüssigkeit dem Verdauungsgemenge hinzugefügt. Nach 2 Tagen im Brutofen schien die Tryptophanabspaltung immerhin Fortschritte gemacht zu haben und betrug (wie das PWS.-Barytverfahren lehrte) ca. ein Viertel der gesamten im Fibrin enthaltenen Tryptophanmenge.

5. Versuch: Fibrinverdauung in Acetatpuffergemisch. 200 g feuchten (in NaF 2% aufbewahrten) Fibrins wurde, einem Vorgange von P. Rona und F. Arnheim[1]) folgend, in einer aus Natriumacetat und

[1]) P. Rona und F. Arnheim (Biochem. Zeitschr. 57, 84. 1913) fanden das Erepsin dem Trypsin in seinen Wirkungsbedingungen sehr ähnlich: Optimum bei $(H) = 2 \cdot 10^{-8}$. Ein aus 4,0 ccm n-Na-Acetat und 0,3 ccm n-Na_2CO_3 zusammengesetztes Regulatorgemisch hat $(H) = 2 \cdot 210^{-8}$, $p_H = 7 \cdot 66$.



Natriumcarbonat zusammengesetzten Puffermischung (400 ccm n-Natriumacetat + 30 ccm n-Na_2CO_3 + 570 ccm H_2O) mit 5 g eines sehr wirksamen Pankreastrockenpräparates (das wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Ernst Freund verdankten) unter Chloroformzusatz im Brutofen der Verdauung überlassen.

Nach 5tägiger Verdauung wurde eine Probe von 100 ccm mit 10 ccm HCl 10% und 130 ccm PWS 10% ausgefällt. Im Filtrate (das unverdünnt mit PWS noch eine Fällung gab, nach mehrfacher Verdünnung aber nicht mehr) fand sich (nach Durchführung der Baryt-CO_2-Behandlung) colorimetrisch 0,032 g Tryptophan, was, auf die ganze Verdauungsflüssigkeit umgerechnet, 0,32 g Tryptophan bedeutet.

Es wurde 5 g neues Ferment hinzugefügt und die Verdauung noch 5 Tage lang fortgesetzt. Nunmehr ergab das PWS-Barytverfahren 0,66 g freies Tryptophan. Die gesamte zur Verdauung gelangte Fibrinmenge hatte 1,0 g gebundenes Tryptophan enthalten.

Das Ergebnis war sonach in diesem Falle günstiger, wie bei den früheren Versuchen, insofern zwei Drittel der gesamten vorhandenen Tryptophanmenge zur Abspaltung gelangt waren.

6. Versuch: Fibrinverdauung in Acetatpuffergemisch, Erepsin. Parallelversuch zu Versuch 5, nur mit dem Unterschiede, daß „Pankreatin Rhenania activum“ als Ferment diente. Zur Verdauung gelangten (nach Kjeldahl und Colorimetrie) 18,7 g Fibrin mit einem Tryptophangehalt von 5,09%, i. c. 0,95 g Tryptophan. Davon fanden sich im freien (durch PWS nicht fällbaren) Zustand nach 2tägiger Verdauung 0,18 g, d. i. ein Fünftel, nach 8 Tagen aber 0,62 g, d. i. wiederum zwei Drittel der vorhandenen Tryptophanmenge.

Wir versuchten in den vereinigten Verdauungsflüssigkeiten der Versuche 5 und 6 durch Erepsin[1]) die Verdauung noch weiter zu treiben. Das PWS-Barytverfahren ergab nunmehr, daß von einer Gesamtmenge von 0,97 g Tryptophan 0,68 g in Freiheit gesetzt worden war, also doch wiederum nur zwei Drittel der gesamten Menge.

Um festzustellen, ob es sich wirklich um freies Tryptophan handle, wurden die vereinigten Verdauungsgemische stark eingeengt und in der Kälte stehen gelassen. Nach Abtrennung des massenhaft auskrystallisierten Tyrosins wurde die Quecksilbersulfatfällung nach Hopkins ausgeführt und der Niederschlag in üblicher Weise zerlegt. Es resultierte schließlich erst eine Krystallisation von zu Büscheln angeordneten Nädelchen, dann von Plättchen, die abgetrennt sich als Tryptophan erwiesen.

[1]) Die ganze Darmschleimhaut eines 23jährigen Selbstmörders wurde abgeschabt, mit viel Quarzsand und ca. 50 ccm Puffermischung (s. oben) 2 Tage in der Kälte stehen gelassen. Sodann wurde die schleimige Masse durch ein Porzellanfilter abgetrennt und die Flüssigkeit weiter verwendet.

7. Versuch: Pepsin-Trypsinverdauung. 620 g frischen, abgepreßten Fibrins in $2^1/_2$ l HCl 0,4% unter Zusatz von 5 g Pepsin und Toluol im Brutofen zur Verdauung angesetzt; bereits am nächsten Tage fast vollständige Lösung. Es wurde nunmehr mit Natronlauge neutralisiert und 400 ccm n-Natriumacetat + 30 ccm n-Na_2CO_3 hinzugefügt. Die Sörensen-Titration ergab für 20 ccm nach Formolzusatz eine Aciditätszunahme: nach 3 Tagen 8,9 ccm $^n/_5$-HCl, nach 5 Tagen 11,5 ccm, nach 7 Tagen 12,1 ccm, nach 10 Tagen 13,1 ccm $^n/_5$-HCl. Umgerechnet auf den Gesamt-N-Gehalt der Flüssigkeit (0,58% N) bedeutet dies eine Abspaltung von 32% des N in Form von formoltitrierbarem Amino-N. Die Colorimetrie ergab für die gesamte Flüssigkeit 3,75 g Tryptophan, davon in freier (durch PWS nicht fällbarer) Form 1,07 g i. c. 29% Tryptophan.

Es war sonach etwa ein Drittel des vorhandenen Tryptophans in Freiheit gesetzt worden, und die Tryptophanabspaltung hatte mit der Abspaltung der Aminosäuren im allgemeinen ungefähr gleichen Schritt gehalten.

8. Versuch: Fibrinverdauung mit Trypsin (Röhm und Haas) und Duodenalsaft. 100 g feuchten (in NaF 2% aufbewahrten) Fibrins wurden mit Wasser ausgewaschen und in 0,1% $NaHCO_3$ suspendiert, dazu etwas Neutralrot als Indikator und portionenweise $^1/_2$ g eines sehr wirksamen, wasserlöslichen Trypsinpräparates, das wir der besonderen Gefälligkeit der Firma Dr. Röhm und Haas in Darmstadt verdanken. Die Reaktion wurde durch vorsichtigen HCl-Zusatz dauernd entsprechend einer Übergangsfärbung des Indikators zwischen Gelb (alkalisch) und Rosa (sauer) erhalten. Es wurde, wie früher, die Aminosäureabspaltung einerseits, die Tryptophanabspaltung andererseits verfolgt. Nach 6 Tagen wurde etwas frischer menschlicher Duodenalsaft (durch Abheberung gewonnen) hinzugefügt. Es fand sich:

Nach 6 tägiger Trypsinverdauung 24% des N als Amino-N (Sörensen) und 32% des Tryptophans als freies Tryptophan, nach 10 tägiger Verdauung mit Zusatz von Duodenalsaft 38% des N als Amino-N (Sörensen) und 43% des Tryptophans als freies Tryptophan.

Also auch in diesem Falle hatten Abspaltung des Tryptophans und des Amino-N annähernd gleichen Schritt gehalten.

9. Parallelversuche: Fibrinverdauung in Phosphat- und Borat-Puffermischung. Je 90 g feuchten Fibrins wurden suspendiert in

A	B
$^1/_2$ l Phosphat-Puffermischung	$^1/_2$ l Borat-Puffermischung
(vgl. P. Rona in Abderhaldens Arbeitsmethode 5, 1/96)	
enthaltend	enthaltend
495 ccm $^n/_{15}$-Na_2HPO_4 + 5 ccm $^n/_{15}$-KH_2PO_4	287,5 ccm einer Borsäurelösung, hergestellt durch Lösen von 0,2

		Mol. (12,404 g) Borsäure in 100 ccm n-NaOH und Verdünnung mit Wasser auf 1 l + 212,5 cm $^n/_{10}$-HCl
p_H nach Rona = 8,171		p_H nach Rona = 8,137
Mit 1,2 g Trypsin Dr. Röhm und Toluol im Brutofen zur Verdauung angesetzt		dgl.
Sörensen-Titration ergab in 20 ccm der Flüssigkeit nach Formolzusatz eine Aciditätzunahme:		
Nach 4 Tagen	8,6 ccm $^n/_5$-HCl	9,1 ccm $^n/_5$-HCl
„ 6 „	9,3 „ „	8,9 „ „
„ 9 „	7,8 „ „	6,5 „ „
„ 11 „	8,7 „ „	7,7 „ „
Gesamt-N-Gehalt der Flüssigkeit	0,406% N	0,427% N
Davon waren nach 4 Tagen als Amino-N abgespalten	29,5%	29,8%
Der gesamte Tryptophangehalt der Flüssigkeit betrug	0,6 g Tryptophan	0,6 g Tryptophan
Nach Durchführung des PWS-Barytverfahrens fand sich noch	0,21 freies Tryptophan, d. i. . . .	0,16 g Tryptophan
	35% des Gesamttryptophans	27% des Gesamttryptophans.

Also auch hier hatten Aminosäure- und Tryptophanabspaltung ungefähr gleichen Schritt gehalten und dürfte die abgespaltene Menge auf rund kaum ein Drittel der Gesamtmenge geschätzt werden.

4. Darstellung des Tryptophans.

Es ist einleuchtend, daß die Unvollkommenheit der Tryptophanabspaltung die Ausbeuten bei der Darstellung desselben recht ungünstig beeinflussen muß.

Versuch a): Wir haben, um in dieser Richtung einen Aufschluß zu gewinnen, 1140 g feuchten abgepreßten Fibrins (seinem N-Gehalte zufolge 122 g trocknen Fibrins entsprechend) mit 1 l n-N-Acetatlösung + 80 ccm n-Na_2CO_3-Lösung + 4 l Brunnenwasser + 10 g Pankreatin Freund + 10 ccm eines Glycerinpräparates von Pankreatin Rhenania + Toluol im Brutofen zur Verdauung angesetzt. Später wurde noch 5 g Pankreatin absolutum Rhenania hinzugefügt.

Die Aminosäureabspaltung wurde durch Formoltitration nach Sörensen, die Tryptophanabspaltung auf colorimetrischem Wege nach vorausgegangener Beseitigung der Polypeptide durch PWS[1]) verfolgt.

[1]) Wir gingen z. B. so vor, daß 100 ccm der Verdauungsflüssigkeit mit 10 ccm HCl 10% und 130 ccm PWS 10% ausgefällt wurden. Wir überzeugten uns davon, daß das Filtrat keine Biuretreaktion (oder höchstens nur noch Spuren einer solchen) gab und daß weiterer Zusatz von PWS zu

Nach 3wöchentlicher Verdauung ergab die Sörensenbestimmung, daß 48% des Gesamt-N in die formoltitrierbare Aminoform übergegangen waren. Colorimetrisch waren 32% des vorhandenen Tryptophans in freier Form nachweisbar. Das Verdauungsgemenge wurde eingeengt, wobei (etwa 10% des Gesamt-N entsprechend) eine reichliche Tyrosin-Leucin-Krystallisation abgetrennt werden konnte und unter Zusatz neuen Fermentes noch einige Tage lang weiter verdaut. Schließlich ergab die Untersuchung, daß sich 38% des N und 43% des Tryptophans in freier Form vorfanden.

Es wurde nunmehr die Aufarbeitung des Verdauungsgemenges genau nach dem Vorgange von Hopkins und Cole in der Modifikation von Neuberg[1]) durchgeführt. (Vgl. die Vorschrift in Abderhaldens Handlexikon 4, 705. 1911.) Nach starkem Einengen des letzten (entbleiten und mit NH_3 neutralisierten) Filtrates begann die Krystallisation von Geschieben rhombischer Blättchen neben Büscheln kurzer gekrümmter Nadeln. Das Gewicht der abgetrennten und im Vakuum getrockneten Rohkrystallisation betrug 2,14 g. Die Colorimetrie hatte in der Verdauungsflüssigkeit 2,43 g freies, nicht durch PWS fällbares Tryptophan ergeben. Die Übereinstimmung ist sonach eine befriedigende.

Aus einer Probe der Rohkrystallisation wurde eine 0,1%-Lösung (in NaF 2%) hergestellt und diese colorimetrisch mit einer 0,1% Standardlösung aus reinem Tryptophan verglichen. Es ergab sich 0,09% Tryptophan statt 0,10. %Die Rohkrystallisation bestand also tatsächlich weitaus ihrer Hauptmenge nach aus Tryptophan.

In den Mutterlaugen ergab die Colorimetrie noch 1,16 g Tryptophan jedenfalls teilweise noch in gebundener Form. Die Verdauungsflüssigkeit hatte colorimetrisch $5^1/_2$ g Tryptophan enthalten, wovon wir nach Durchführung aller Prozeduren schließlich noch 2,14 + 1,16 = 3 g in Händen behalten hatten.

Eine wesentlich ungünstigere Ausbeute ergab, trotz Anwendung ausgiebiger Mengen stark wirksamer Trypsinpräparate, nachstehender Darstellungsversuch:

Versuch b): 2 kg frischen, abgepreßten Fibrins (237 g getrockneten Fibrins, mit einem Tryptophangehalte von 11,8 g entsprechend) wurden mit 6 l HCl 0,4%, 10 g Pepsin german. und Toluol angesetzt. Es erfolgte im Brutofen schnelle Lösung. Nunmehr wurde mit Lauge gegen Lackmuspapier neutralisiert und 1 l n-Natriumacetat + 75 ccm nNa_2CO_3 + $4^1/_2$ g Trypsin Freund hinzugefügt. Die Sörensentitration in je 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit ergab

---

der (evtl. auf das mehrfache Volumen verdünnten) Flüssigkeit keine Fällung mehr gab. Das Filtrat (oder ein aliquoter Teil desselben) wurde nunmehr mit Ätzbaryt von PWS, mit CO_2 vom Barytüberschusse befreit, eingedampft, filtriert, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und colorimetriert.

[1]) C. Neuberg, Charité-Annalen 30. 1906.



nach 1 Tage		3,7 ccm	$^{n}/_{5}$-HCl
„ 3 Tagen		4,8 „	„
„ 6 „	und Zugabe von 5 g Trypsin Röhm	4,9 „	„
„ 9 „	„ „ „ 2 g Pankreat. Rhenania	6,3 „	„
„ 14 „	„ „ „ 5 g „ „	6,0 „	„

Die nunmehr stockende Verdauung hatte erst eine Abspaltung von Aminosäuren entsprechend 14,6% des Gesamt-N herbeigeführt.

Die Verdauungsflüssigkeit wurde nunmehr, wie früher, nach Hopkins-Neuberg[1]) auf Tryptophan verarbeitet.

Es resultierte schließlich eine Krystallisation von 1,7 g, welche sich durch den colorimetrischen Vergleich als nahezu reines Tryptophan erwies. Es entspricht dies 14,4% des Gesamttryptophans. Der Parallelismus zwischen der gesamten Aminosäuren- und der Tryptophanabspaltung kommt also auch hier zum Ausdruck.

Wenn auch diese Ausbeute als eine besonders ungünstige gelten muß und die Verdauung aus unbekannten Gründen frühzeitig zum Stillstande gekommen war, so ist es doch klar, daß man nicht darauf rechnen kann, durch die tryptische Verdauung auch nur die Hauptmenge des Tryptophans auf präparativem Wege zu gewinnen.

So sehen wir denn z. B. auch, daß E. Abderhalden und M. Kempe[2]) bei Verarbeitung von 5 kg Casein in praxi nicht mehr als 26,5 g Rohtryptophan gewonnen haben, trotzdem, unseren Erfahrungen entsprechend, das Casein 2% Tryptophan enthält und 5 kg Casein demnach ca. 100 g Tryptophan einschließen.

Auch nach den Erfahrungen anderer Autoren schreitet die Trypsinverdauung nur langsam vorwärts. So fanden Henriques und Gjaldbäck[3]) die Spaltung von Hühnereiweiß nach

8	14	30	46	73	Tagen
14%	30%	49%	56%	60%	

Nach einer Verdauungsdauer von 40—70 Tagen betrug der Spaltungsgrad beim Casein 42%, Edestin 45%, Gliadin 43%, Gelatine 25%, Wittepepton 43% usw.

---

[1]) Zur Entfernung der nach Zersetzung der Quecksilbersulfatfällung in der Flüssigkeit verbleibenden Schwefelsäure empfiehlt es sich, statt trocknen Bleicarbonates oder Bleioxydes gut ausgewaschenes, unter Wasser aufbewahrtes Bleihydroxyd zu verwenden, welches sich mit der Schwefelsäure viel leichter und schneller umsetzt.

[2]) E. Abderhalden und M. Kempe, Zeitschr. f. physiol. Chemie 52, 207. 1907.

[3]) Henriques und J. K. Gjaldbäck, Zeitschr. f. physiol. Chemie 75, 363. 1911.

Neuerdings hat Edward M. Frankel[1]) bei Kontrolle der Eiweißspaltung mit Hilfe des van Slykeschen Verfahrens an 13 verschiedenen Eiweißkörpern gefunden, daß Pepsin - Salzsäure innerhalb 100 Stunden etwa 20% des Gesamt-N als Amino-N freimache; nachfolgende Trypsinverdauung bis etwa 70%, Trypsinverdauung allein nur bis 50%. Mit Erepsin dagegen kommt man bis 85—90%.

Es ist also klar, daß wenn man wirklich die Hauptmenge des in einem Proteine enthaltenen Tryptophans auf rationellem Wege gewinnen wollte, dies nur unter der Mitwirkung des Erepsins möglich sein dürfte.

Leider war es uns, infolge der Ungunst der äußeren Verhältnisse, zurzeit nicht möglich, uns einen Darmfistelhund zu beschaffen und die Erepsinwirkung in bezug auf die Abspaltung des Tryptophans zu verfolgen. Wir beabsichtigen jedoch, sobald als es uns möglich sein wird, unsere Untersuchungen nach dieser Richtung hin zu ergänzen.

Zusammenfassung.

1. Die auf der Voisenetschen Reaktion basierende colorimetrische Methode gestattet es, in tryptischen Verdauungsflüssigkeiten mit Hilfe der Phosphorwolframsäurefällung freies neben gebundenem Tryptophan zu bestimmen.

2. Bei tryptischer Verdauung des Fibrins ist es (trotz sorgfältiger Regulierung der Aciditätsverhältnisse mit Hilfe von Phosphat-, Acetat- oder Boratpuffermischungen) in der Regel nicht möglich gewesen, im Laufe einiger Wochen mehr als ein Drittel, höchstens aber zwei Drittel der vorhandenen Tryptophanmenge in freier Form abzuspalten.

3. Es liegt kein Grund vor, dem Tryptophan analog wie dies vom Tyrosin behauptet wird, eine besonders exponierte Stellung in der Struktur des Eiweißmoleküls zuzuschreiben. Denn es wird nicht, wie dies beim Tyrosin der Fall zu sein scheint, bereits in den ersten Phasen des Verdauungsprozesses seiner Hauptmenge nach in Freiheit gesetzt. Vielmehr schreitet seine Abspaltung nur ganz allmählich und wie die Formoltitration nach Sörensen lehrt, im großen ganzen parallel mit der Abspaltung der Aminosäuren im allgemeinen fort.

[1]) Edward M. Frankel (New Haven), Journ. biol. Chemie 26, 31. 1917.

Die Bestimmung der Wasserstoffzahl durch Indicatoren.

Von

L. Michaelis und A. Gyemant.

(*Eingegangen am 8. Juni 1920.*)

Mit 9 Abbildungen im Text.

Der Gedanke, die Konzentration der Wasserstoffionen mit Hilfe von Indicatoren zu bestimmen, geht auf zwei Reihen von Arbeiten zurück, die fast gleichzeitig erschienen.

Die eine stammt von H. Friedenthal und Ed. Salm[1]), die andere von Fels und von Salessky aus dem Institut von Nernst[2]), aus dem gleichen Institut ging auch eine Arbeit von Joel Hildebrand[3]) hervor, welcher die Abhängigkeit der Farbtiefe des Phenolphthaleins von der h spektrophotometrisch studierte. Während alle diese Arbeiten mit der Annahme arbeiteten, daß die Farbnuance allein von den H-Ionen bestimmt wird, zeigten Bohdan v. Szyskowski[4]) sowie Michaelis und Rona[5]), daß die Anwesenheit anderer Ionen nicht immer belanglos für die Farbe der Indicatoren ist. Die vollkommenste Form dieser Indicatoren-Methode ist die von S. P. L. Sörensen[6]). Seine Methode beruht darauf, daß man die zu untersuchende Lösung mit einem passenden Indicator versetzt und diejenige Pufferlösung ausprobiert, welche diesem Indicator die gleiche Nuance erteilt. Das p_H der zu untersuchenden Lösung ist dann gleich dem der Pufferlösung und dieses ist aus dem durch elektrometrische Messung geeichten Diagramm der Puffer von Sörensen abzulesen. Die Methode erfordert als Vorbereitung nur, eine Reihe von sorgfältig hergestellten Standardlösungen unter CO_2-sicherem Verschluß vorrätig zu halten.

[1]) H. Friedenthal, Zeitschr. f. allg. Physiol. **1**, 56. 1901; **4**, 44. 1904; Arch. f. Anat. u. Physiol. 1903 (Verhandlg. d. Berliner physiol. Gesellschaft); Ztschr. f. Elektrochemie **10**, 113. 1904; Ed. Salm, Zeitschr. f. physikal. Chemie **57**, 471. 1907; **63**, 83. 1908; Salm u. Friedenthal, Zeitschr. f. Elektrochemie **13**, 125. 1907.

[2]) Fels, Zeitschr. f. Elektrochemie **10**, 208. 1904. Salessky, Zeitschr. f. Elektrochemie **10**, 204. 1904.

[3]) J. Hildebrand, Zeitschr. f. Elektrochemie **14**, 349. 1908.

[4]) Bohdan v. Szyskowski, Zeitschr. f. physikal. Chemie **58**, 420. 1907.

[5]) Michaelis u. Rona, Zeitschr. f. Elektrochemie **14**, 251. 1908.

[6]) Sörensen, Biochem. Zeitschr. **21**, 131. 1909; Sörensen und Palitzsch, daselbst **24**, 381 u. 387 .1910; dieselben, ebenda **51**, 307. 1913.

Die Indicatorenmethode läßt sich nun auch nach einem anderem Prinzip ausführen, welches nicht einmal diese Vorbereitung erfordert. Das Prinzip ist nicht neu, es liegt eigentlich allen Arbeiten vor Sörensen zugrunde, aber es ist noch nicht zu einer so abgerundeten Methode, wie es die Sörensensche ist, ausgearbeitet worden. Die Methode von Sörensen hat sich weit verbreitet und ist durch Einführung neuer geeigneter Indicatoren durch Sörensen und Palitzsch (l. c.) Lubbs und Clark[1]) weiter vervollkommnet worden. Wenn wir dennoch unsere Methode veröffentlichen, so begründen wir das mit folgendem: Unsere Methode erspart die Herstellung der Pufferlösungen, und zweitens ist sie ohne Vorbereitung für die p_H-Messung bei jeder beliebigen Temperatur anwendbar. Die Sörensensche Methode ist für Zimmertemperatur von 18° geeicht. Abweichungen von wenigen Graden machen zwar noch keine merklichen Änderungen, aber schon für 37° ist sie nicht mehr genau. Um sie anderen Temperaturen anzupassen, müßte man dieselbe Eichung, die Sörensen für 18° durchgeführt hat, für alle anderen Temperaturen ausführen, was zwar möglich, aber mühselig ist. Bei unserer Methode genügt es, den Temperaturkoeffizienten der Dissoziationskonstante des Indicators zu kennen, um eine p_H-Messung bei beliebiger Temperatur auszuführen. Diese Temperaturkoeffizienten sind nun für einen Teil der Indicatoren aus der Literatur schon zu entnehmen, für die anderen konnten wir sie durch einige Messungen leicht ergänzen. Aus diesen beiden Gründen glauben wir, daß es nicht überflüssig ist, unsere Methode zu beschreiben.

I. Prinzip der Methode.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß man mit einem einfarbigen Indicator (also z. B. Phenolphthalein, Nitrophenol, nicht aber Lackmus, Methylorange) die in der zu untersuchenden Lösung vorhandene Farbtiefe im Verhältnis zu der bei Alkaliüberschuß überhaupt erreichbaren maximalen Farbtiefe bestimmt. Dieses theoretisch so naheliegende Prinzip wurde experimentell eigentlich nur vereinzelt für andere Zwecke angewendet.

---

[1]) H. A. Lubbs u. W. M. Clark, Journ. of the Washington Acad. of Sciences 5, 609. 1915.

So haben Hildebrand (l. c.) und Wegscheider[1]) nach diesem Prinzip die Dissoziationskonstante des Phenolphthaleins bestimmt. Für den von uns angestellten Zweck, für die Messung der h in beliebiger Flüssigkeit, hat H. Th. Tizard[2]) dieses Prinzip experimentell durchzuführen versucht, und zwar an zwei Indikatoren, Methylorange und Methylrot. Diese Indicatoren sind entgegen der von uns gestellten Forderung zweifarbig. Um das Prinzip durchführen zu können, muß Tizard die Farbtiefe des Methylorange in seinen verschiedenen Zuständen vergleichen. Diesem Verfahren liegt die Beobachtung zugrunde, daß die Farbtiefe der roten Modifikation etwa 18 mal so groß ist, wie die der gelben. Die Annahme der gleichmäßigen Vertiefung der Farbe beim Übergang von der gelben zur roten Modifikation gestattet ihm, aus der Farbtiefe den Dissoziationsgrad und somit auch die h zu berechnen. Ebenso bei Methylrot. Die Schwierigkeit in der Beurteilung bei den zwei qualitativ verschieden gefärbten Flüssigkeiten schlägt er nicht hoch an, im Gegensatz zu Veley[3]), der bei ähnlichen Versuchen auf große Schwierigkeiten stieß. Theoretisch scheint ein solches Verfahren nicht einwandfrei, wenn auch die guten Resultate von Tizard das Gegenteil zu beweisen scheinen. Das Anwendungsbereich kann jedoch nur gering sein, die Methode hat sich auch nicht eingebürgert. Es ist jedenfalls erwünscht, dieses Prinzip an einfarbigen Indicatoren durchzuführen, bei denen die theoretische Grundlage einwandfrei ist.

Natürlich kann man ein ganz ähnliches Prinzip auch für zweifarbige Indicatoren anwenden, worauf schon Bjerrum (s. unten) hingewiesen hat. So kann man z. B. die Zusammensetzung einer violetten Lakmuslösung aus ihren beiden Componenten, rot und blau, dadurch feststellen, daß man ausprobiert, welche optische Mischung einer roten und einer blauen Lakmuslösung der zu untersuchenden wirklichen Mischung beider Modifikationen entspricht. Technisch viel einfacher ist aber die Untersuchung mit einfarbigen Indicatoren.

Wir wenden also solche Indicatoren an, welche von farblos nach gefärbt (Gelb, Rot) umschlagen. Um die Theorie möglichst einfach zu beginnen, nehmen wir zunächst an, daß der Indicator (welcher in unseren Fällen eine Säure ist) nur in zwei Modifikationen existenzfähig ist, in Form der (undissoziierten) Säure oder vielmehr Pseudosäure im Sinne von Hantzsch, und als gefärbtes Ion. Wir sehen also zunächst davon ab, daß der Indicator zum Teil auch als (undissoziiertes) Salz bestehen könne. Wir nehmen also z. B. an, daß p-Nitrophenol als Säure farblos, als Ion gelb

---

[1]) Wegscheider, Zeitschr. f. Elektrochemie **14**, 510. 1908.

[2]) Tizard, Journ. of the chem. soc. of London. Transactions **97**, 2477. 1910; **97**, 2490. 1910. Tizard and Whiston, Journ. of the chem. soc. **117/8**, 150. 1920.

[3]) Veley, Zeitschr. f. physikal. Chemie **57**, 147. 1906; Journ. of the chem. soc. Transact. 1907.

sei und daß Natrium-Nitrophenolat total elektrolytisch dissoziiert sei, d. h. als solches in meßbarer Menge nicht existiere. Wenn man nun eine beliebige Flüssigkeit, deren h in dem Übergangsgebiet des p-Nitrophenol liegt, mit einer ganz bestimmten Menge Indicator versetzt und zweitens eine verdünnte Lösung von NaOH mit der gleichen Menge des Indicators, so wird man colorimetrisch bestimmen können, wie die Konzentrationen der gelben Molekülart in den beiden Lösungen sich verhalten. In der NaOH-Lösung existiert der Indicator nur als Ion, durch die colorimetrische Vergleichung der Lauge und der zu untersuchenden Lösung erfährt man daher für die letztere den prozentischen Anteil der Indicatorionen im Vergleich zur Gesamtmenge des Indicators, oder wir erfahren den Dissoziationsgrad α des Indicators. Nun besteht zwischen der Wasserstoffzahl h und dem Dissoziationsgrad α einer Säure folgende Beziehung[1]):

$$h = k \cdot \frac{1 - \alpha}{\alpha},$$

wo k die Dissozoiationskonstante der Säure, also hier des Indicators bedeutet. Ist diese für den betreffenden Indicator bekannt, so gibt die Gleichung in einfachster Weise die Wasserstoffzahl.

Es handelt sich also nur noch darum, einige geeignete „einfarbige“ Indicatoren auszuwählen und ihre Dissoziationskonstanten zu bestimmen. Bjerrum[2]) hat in seiner ausgezeichneten Monographie über die Indicatoren eine genügende Zahl einfarbiger Indicatoren vermißt. Es war unsere erste Aufgabe, diese Lücke auszufüllen. Wir entschieden uns für folgende Indicatoren (Tab. I), mit denen wir vorläufig wohl für die wichtigsten in Betracht kommenden Gebiete der h auskommen, und bestimmten ihre Dissoziationskonstanten zunächst bei 18° nach der im folgenden Abschnitt angegebenen Methode.

Das Prinzip der Anwendung wird am besten durch ein Beispiel klar (ausführliche Beschreibung vgl. weiter unten). Es soll

---

[1]) Das folgt aus den Dissociationsgesetzen: z. B. aus Gleichung 12, S. 18 in Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914, Julius Springer.

[2]) N. Bjerrum, Die Theorie der alkalimetrischen und acidimetrischen Titrierungen. Sammlung chem. und chem.-techn. Vorträge 21. Stuttgart 1914.

Tabelle I.

Indicator	Farbe	k für 18°	p_k für 18°	Bester Anwendungsbereich
Pikrinsäure	gelb	$6,8 \cdot 10^{-1}$	0,26	0—1,8
β-Dinitrophenol 1:2:6	gelb	$2,04 \cdot 10^{-4}$	3,69	1,7—4,4
α-Dinitrophenol 1:2:4	„	$8,5 \cdot 10^{-5}$	4,06	2,0—4,7
p-Nitrophenol	„	$6,6 \cdot 10^{-8}$	7,18	4,7*)—7,9
m-Nitrophenol	„	$4,6 \cdot 10^{-9}$	8,34	6,3—9,0
Phenolphthalein	rot	$1,86 \cdot 10^{-10}$	9,73	8,5—10,5
m-Nitrobenzolazosalicylsäure	gelb	$7,0 \cdot 10^{-12}$	11,16	10,0—12,0

*) Die Grenze 4,7 ist etwas weit gesteckt. Bei ganz farblosen Lösungen ist sie zwar gut brauchbar, und solange wir noch keine Erfahrungen über einen zwischen p-Nitrophenol und Dinitrophenol 1:2:4 stehenden Indicator haben, wollen wir dieses etwas weite Anwendungsbereich festhalten. Wir glauben, in Dinitrophenol 1:3:4 einen geeigneten Indicator für diese Lücke empfehlen zu können, haben aber noch keine praktischen Erfahrungen mit diesem gesammelt.

Die Zahlen an den Namen der Dinitrophenole geben die Stellung $OH : NO_2 : NO_2$ an.

p_H irgendeiner Flüssigkeit gemessen werden. Wir versetzen 5 ccm dieser Flüssigkeit mit z. B. 0,5 ccm einer 0,1 proz. wässerigen Lösung von p-Nitrophenol. Die Flüssigkeit wird dadurch schwach gelb gefärbt. Nun nehmen wir 5 ccm einer verdünnten, etwa 0,01—0,1 n-NaOH und probieren, wieviel Indicator wir zur Erreichung der gleichen Farbtiefe zufügen müssen. Wir finden z. B. 0,01 ccm. Dann ist $\alpha = \frac{0,01}{0,5}$, und, wenn wir dies in die obige Formel einsetzen, erhalten wir unmittelbar h.

II. Die Dissoziationskurven der Indicatoren.

Puffergemische, deren Gehalt an Na oder K 0,05 n nicht überstieg und meist noch viel geringer war, und welche in Anbetracht der Kleinheit des Salzfehlers als praktisch salzfrei betrachtet werden konnten, wurden einerseits auf ihr p_H mit der Gaskette gemessen, andererseits wurden je 10 ccm mit 1 ccm Indicator versetzt und die Farbstärke colorimetrisch durch Vergleich mit einer Lösung desselben Indicators in $^n/_{100}$-NaOH bestimmt. Die mit dem Indicator versetzten Lösungen sind für die Messung in der Gaskette nicht geeignet, weil viele organische Farbstoffe, insbesondere die Nitrokörper an der H-beladenen Platinelektrode reduziert werden und die Einstellung eines konstanten Potentials verhindern[1]). Es ist aber ganz unbedenklich,

[1]) Bei dauernder heftiger H_2-Durchströmung auch während der Ablesung bekommt man ziemlich gut und richtig sich einstellende Poten-

die p_H-Messung vor Zusatz des Indicators auszuführen, weil p_H in gut gepufferten Lösungen weit innerhalb der Fehlergrenzen durch den Indicatorzusatz nicht geändert wird.

Die Indicatoren.

Von unseren Indicatoren wurden von Kahlbaum bezogen Phenolphthalein, *p*-Nitrophenol und α-Dinitrophenol ($OH : NO_2 : NO_2 = 1 : 2 : 4$). Das β-Dinitrophenol (1 : 2 : 6) verdanken wir Herrn Dr. Gerngross (techn.-chem. Laborat. der techn. Hochschule Charlottenburg), dem wir auch sonst für einige Ausgangsprodukte und Materialien zu Danke verpflichtet sind. Das m-Nitrophenol, unser wichtigster Indicator für die Gegend der Neutralität, bisher als Indicator noch niemals angewendet, war bisher im Handel nicht erhältlich. Wir möchten deshalb auf seine Darstellung näher eingehen. Wir legten der Darstellung die Vorschrift von Bantlin[1]) und von Henriques[2]) zugrunde und arbeiteten folgendermaßen. 13,8 g m-Nitranilin ($^1/_{10}$ Mol.) werden in 150 ccm verdünnter H_2SO_4 (10 Gewichtsprozente H_2SO_4) unter Erwärmen gelöst, in Kältemischung gekühlt und dazu eine Lösung von 7 g reinem Natriumnitrit in 25 ccm Wasser hinzugefügt. Nach $^1/_2$ Stunde wird mit verdünnter H_2SO_4 (wie oben) auf 1,5 l verdünnt, schnell zum Sieden erhitzt und nahezu im Sieden erhalten, bis die Stickstoffentwicklung aufhört. Noch heiß wird die Lösung durch ein gewöhnliches Filter von kleinen Mengen dunklen Harzes, das sich beim Kochen gebildet, abfiltriert. Das trübe, hellgelbe Filtrat wird nach dem Abkühlen einige Male ausgeäthert und der Äther verdampft. Es hinterbleibt ein gelbes Öl, welches bald zu teilweise hellgelben, teilweise dunkelgelben Krystallen erstarrt. Ausbeute gegen 9,6 g (70% der Theorie). Aus diesem Rohprodukt kann nur unter ziemlichen Verlusten der reine Körper gewonnen werden. Die Substanz wird mit 60 ccm 12 proz. HCl ausgekocht, die Lösung noch warm in ein Bechergläschen von dem dunkleren Öl abgegossen oder abfiltriert. Der Abguß stellt alsbald eine milchige schwefelgelbe Flüssigkeit dar, welche meist noch kleine Mengen eines dunkelgelben Öls enthält. Dies sammelt sich, wenn man das Glas öfters leicht aufstößt, auf dem Boden zusammen. Man gießt die Flüssigkeit möglichst vollständig wiederholt von diesem Öl ab und stellt sie in den Eisschrank. Das reine m-Nitrophenol krystallisiert dann in ganz schwachgelben, fast weißen Krystallen. Es wird abgesaugt und die Salzsäure durch wenig Wasser ausgewaschen. Befand sich noch etwas von dem dunklen Öl in der Mutterlauge, so findet man dieses als dunkelgelbe Krystalle wieder. Sie können durch Auslesen

tiale. Das beruht darauf, daß der von dem Farbstoff verbrauchte, der Platinelektrode entnommene Wasserstoff beim ständigen Durchströmen ständig ersetzt wird. Dies muß nachträglich auch als wahrer Grund dafür angegeben werden, warum bei der p_H-Messung einer Methylenblaulösung (Rona u. Michaelis, diese Zeitschr. **103**, 23) ständiges Durchströmen mit H_2 notwendig war.

[1]) Bantlin, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **10**, 524.

[2]) Henriques, Liebigs Ann. **215**, 323.

leicht entfernt werden. Der Rest des Ätherrückstandes wird noch einige Male auf die gleiche Weise mit HCl ausgekocht und ebenso verarbeitet. Das reine Präparat schmilzt bei 96°. Ausbeute an einem fast reinem Präparat (Fp. etwa 90°) 4,5 g. Das ganz reine Präparat wurde in noch kleinerer Ausbeute erhalten. Auf unsere Veranlassung wird das Präparat auch von Kahlbaum hergestellt. Dieses Präparat enthält aber noch große Mengen jener dunkelgelben Krystalle. Man lese zur Benutzung nur die ganz hellen aus. Um uns zu überzeugen, inwiefern dieses dunkelgelbe Nebenprodukt die Eigenschaften des Indicators stört, stellten wir uns dieses aus den Ätherrückständen dar. Diese wurden noch einige Male mit verdünnter HCl ausgekocht und das zurückbleibende braune Öl untersucht. Es erstarrt beim Abkühlen zu einer rotbraunen Massse. Eine abgewogene Probe dieser Substanz wurde in einigen Tropfen Alkohol gelöst und mit Wasser auf diejenige Verdünnung gebracht, in welcher sonst das m-Nitrophenol verwendet wurde (0,3%). Es enstand eine schwach gelbliche milchige Emulsion. Wurde diese als Indicator verwendet, in einer Konzentration, bei der die Trübung nicht mehr störte, so verhielt sich die Lösung genau so, als ob sie noch einen kleinen Rest von echtem m-Nitrophenol enthielte. Der braune Körper selbst ist somit sehr schwer löslich und hat ferner auf das Wasser nur ein äußerst geringes färbendes Vermögen. Es verhält sich nicht wie ein Indicator und wirkt daher, wenn er dem Nitrophenol in geringen Mengen beigemengt ist, nicht störend. Hieraus ergeben sich folgende Vorschriften, um das m-Nitrophenol auf seine Brauchbarkeit als Indicator zu prüfen: Die 0,3proz. wässerige Stammlösung wird 5—10mal mit Wasser verdünnt. Eine Probe dieser Verdünnung mit einigen Tropfen von $^{m}/_{15}$ primärem Kaliumphosphat (Sörensen) muß völlig farblos sein, eine zweite Probe mit einigen Tropfen $^{m}/_{15}$ sekundärem Natriumphosphat (Sörensen) muß (grünlich-)gelb werden, eine dritte Probe mit einigen Tropfen NaOH muß deutlich noch stärker (bräunlich-) gelb werden.

Der letzte unserer Indicatoren ist m-Nitrobenzolazosalicylsäure, den wir im folgenden kurz Salicylgelb nennen werden. Was uns veranlaßte, diesen Körper zu versuchen, werden wir später auseinandersetzen. Wir entnehmen aus den Farbstofftabellen von Schultz und Julius, daß dieser Körper 1887 schon von Nietzki dargestellt wurde und unter dem Namen Alizaringelb GG. im Handel ist. Der Körper wird dargestellt, indem man m-Nitranilin diazotiert und an Salicylsäure kuppelt. Als einfachstes Verfahren zur Darstellung können wir folgende Vorschriften geben. 6,9 g ($^{1}/_{20}$ Mol) m-Nitranilin wird in 11 ccm 9-n-Salzsäure und 200 ccm Wasser gelöst, dazu etwa 30 g Eisstückchen gegeben und nach genügender Abkühlung mit 3,5—4 g NaN NO_2, gelöst in 40 ccm Wasser, versetzt und auf 1 l aufgefüllt. Nach einiger Zeit wird diese Lösung allmählich in eine Lösung von 6,4 g Salicylsäure in 50 ccm 15proz. NaOH gegossen und die tieforangerote Lösung nach einiger Zeit filtriert, das Filtrat mit einem Überschuß von HCl versetzt und der gebildete hellgelbe Niederschlag nach dem Absetzen abgenutscht und mit H_2O gewaschen. Der noch feuchte Niederschlag wird nochmals in Lauge gelöst, mit Säure

gefällt, abgenutscht, gewaschen und getrocknet. Der Farbstoff bildet eine amorphe gelbe Masse, welche in starker Lauge je nach der Konzentration mit orange- bis rein gelber Farbe löslich ist. Beim Ansäuren mit Essigsäure geht die Farbe in eine schwach kanariengelbe über, in verdünnter Lösung kaum merklich gefärbt. Durch Überschuß von HCl wird eine sehr verdünnte Lösung völlig entfärbt, eine stärkere gibt einen schwach gelben flockigen Niederschlag. Offenbar ist die stark alkalische Lösung ein sekundäres Salz, die hellgelbe ein primäres und die farblose die freie Säure. Im strengen Sinne ist dieser Indicator daher kein einfarbiger, wir werden aber sehen, daß er praktisch als solcher benutzt werden kann.

Alle diese Indicatoren sind jetzt durch G. Grübler (Leipzig) zu beziehen.

Über die Menge des verwendeten Indicators geben die Angaben S. 203 Auskunft. Für die Wahl der Menge ist zunächst die Erreichung eines zur Farbvergleichung geeigneten, nicht zu starken Farbentons maßgebend.

Die elektrometrische Messung.

Die Messung wurde mit einer Elektrode mit strömendem Wasserstoff ausgeführt. Wir benutzten dazu ein Modell, welches der eine von uns (M) schon seit längerer Zeit benutzt und sich für alle Flüssigkeiten, bei denen Durchströmung mit Wasserstoff gestattet ist (also CO_2-freie Flüssigkeiten oder Flüssigkeiten mit $p_H \gtreqless 5$) so praktisch erwiesen hat, daß wir sie, obwohl an guten Elektroden kein Mangel ist, an dieser Stelle doch beschreiben wollen.

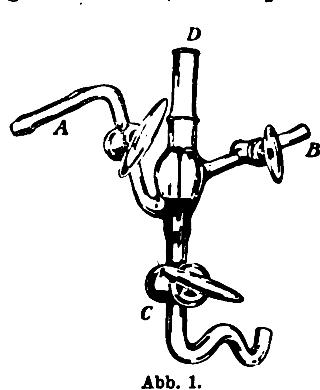


Abb. 1.

Die Elektrode (Abb. 1) besteht aus einem starken Platindraht, der an dem eingeschliffenen Glasstopfen *D* befestigt ist. Dieser ist oben hohl und mit Quecksilber gefüllt, als Kontakt für den Ableitungsdraht. Die Elektrode wird in der Weise gefüllt, daß man die Öffnung *A* in die Lösung taucht und von der Öffnung *B* her bei passender Stellung der Glashähne ansaugt. Das Rohr *C* wird luftblasenfrei mit derselben Lösung gefüllt; Wasserstoff wird bei *A* eingeleitet, bei *B* abgeleitet, am besten in ziemlich lebhaftem Strom, etwa 2 Minuten lang. Die Füllung des birnförmigen Gefäßes mit der Flüssigkeit ist am günstigsten ein wenig höher als in der Zeichnung angegeben. Nach Wasserstoffdurchströmung schließt man erst Hahn *B*, dann *A* und öffnet *C*.

Die Ableitung geschieht mit einem zu einer Spitze ausgezogenen Glasheber, der mit KCl-Agar gefüllt ist (40 g KCl, 100 g Wasser, 3 g Agar werden verkocht und zur Füllung des Hebers benutzt). Das andere Ende des Agar-Hebers taucht in gesättigte KCl-Lösung, in die auch die Ableitungselektrode taucht. Nunmehr liest man sofort das Potential ab, wiederholt dann die Wasserstoffdurchströmung noch einige Male je eine halbe Minute lang bis zur Konstanz des Potentials. Die Höhe des abgebildeten Gefäßes beträgt 11 cm. (Es wird von Bleckmann und Burger, Berlin, Auguststr. 3a angefertigt.)

Die colorimetrische Messung.

Für die colorimetrische Messung müssen wir zunächst die Frage nach der Herstellung der colorimetrischen Vergleichslösung erörtern. Diese soll so beschaffen sein, daß der Farbstoff seine maximale Farbstärke hat, sie soll also möglichst stark alkalisch sein. Dies darf jedoch nicht übertrieben werden. Durch ganz starke Lauge erleiden nämlich alle diese Farbstoffe allmählich irreversible chemische Änderungen. Die Nitrokörper werden dunkler, das Phenolphthalein heller. Die hierzu angestellten Versuche ergaben folgendes. p-Nitrophenol in gleicher Menge war in n-NaOH dunkler als in $^{n}/_{100}$-NaOH, und zwar verhielten sich die Farbstärken in zwei Versuchen wie 1 : 0,91 resp. 1 : 0,92. Bei einem Versuch mit n- und $^{n}/_{300}$-NaOH war das Verhältnis 1 : 0,92. Ähnliche Werte ergaben sich für α-Dinitrophenol. Bei n- und $^{n}/_{10}$-NaOH erhielten wir Verhältniszahlen wie 1 : 0,91; 1 : 0,96; 1 : 0,84; bei n- und $^{n}/_{100}$-Lauge 1 : 0,80 und 1 : 0,91; immer die n-Lösung stärker gefärbt; in $^{n}/_{10}$- und $^{n}/_{300}$-NaOH waren die Farben einander gleich. Es scheint also tatsächlich durch Laugen von 1 n an eine sekundäre Verfärbung einzutreten. Es sei aber in Anbetracht der früheren theoretischen Erörterungen ausdrücklich hervorgehoben, daß dies eine (irreversible) Wirkung der Hydroxyl- und nicht der Natriumionen ist. Denn als wir gleiche Mengen von p-Nitrophenol in $^{n}/_{50}$-NaOH mit und ohne 1 n-KCl untersuchten, fanden wir sie gleich; genauer: dasjenige mit Salz heller, und zwar im Verhältnis 1 : 0,97, mit α-Dinitrophenol war jenes mit Salz dunkler im Verhältnis 1 : 0,95; Abweichungen, welche in diesem Gebiet der Colorimetrie (vgl. unten) sicher innerhalb der Fehlergrenzen fallen.

Beim Phenolphthalein herrschen ganz andere Verhältnisse. Dieses wird durch starke Laugen, wie bekannt, abgeblaßt. Der Grund dafür ist zunächst die Bildung der schon mehrfach beschriebenen[1]) dreiwertigen ungefärbten Salze, aber außerdem eine irreversible chemische Veränderung. Die Geschwindigkeit dieser Farbänderung ist aber erst bei sehr hoher OH-Konzentration praktisch von Belang. Bei $^{n}/_{100}$-NaOH bemerkt man in Zeiten, welche für die Versuchsanordnung in Betracht kommen, innerhalb der Fehlergrenzen der Colorimetrie noch nichts von dieser Veränderung. Die [OH′] ist aber mehr als hinreichend, um die maximale Farbstärke zu erreichen. Als wir nun untersuchten, wie es sich bei diesem OH-Gehalt mit der Salzwirkung verhält, stellte es sich heraus, daß genau dieselbe allmähliche Abblassung, die starke Laugen hervorrufen, auch in $^{n}/_{100}$-Lauge zustande kommt, wenn wir 1 n-KCl zusetzen. Die Verhältniszahlen waren z. B. bei $^{n}/_{50}$-NaOH 1 : 0,93, 1 : 0,91. Um das Allmähliche des Abblassens zu demonstrieren, untersuchten wir eine Probe sofort, nach 10 und nach 20 Minuten, wobei folgende Zahlen erhalten wurden: 1 : 0,98; 1 : 0,84; 1 : 0,75. Daß aber der maßgebende Faktor auch hier die Lauge war, bewiesen wir dadurch, daß zwei Proben im Übergangsgebiet ($p_H = 9{,}84$) mit und ohne 1 n-KCl dasselbe Verhältniszahl darboten (1 : 0,76) sowohl im Beginn, als auch später untersucht. Als praktisches Ergebnis dieser Versuche ist zu folgern, daß sowohl eine $^{n}/_{100}$-NaOH-haltige Vergleichslösung, wie auch Flüssigkeiten mit p_H innerhalb des Übergangsgebiets, sogar dann, wenn sie Salze enthalten, für die Colorimetrie als gut haltbar in ihrer Farbstärke zu betrachten sind. Nur für die m-Nitrobenzolazosalicylsäure muß man eher eine etwas stärkere Lauge, etwa $^{1}/_{10}$ n, wählen, um sicher maximale Farbstärke zu erhalten.

Die colorimetrischen Messungen wurden in folgender Weise ausgeführt. Zu 10 ccm der Pufferlösung wurde 1 ccm der Indicatorlösung in geeigneter Konzentration zugefügt. Dann wurden 10 ccm $^{n}/_{100}$-Lauge mit 1 ccm Indikator versetzt und diese mit genau abgemessener Menge $^{n}/_{100}$-Lauge so weit verdünnt, bis die Farbstärke zunächst angenähert die gleiche war, wie in der Pufferlösung; die genaue Beurteilung der Farbstärke wurde in einem Colorimeter nach Duboscq durchgeführt. Es wurden zunächst eine Reihe Ablesungen gemacht, dann die Tröge gewechselt, nochmals in gleicher An-

[1]) P. A. Kober u. J. Th. Marshall, Journ. of the Amer. Chem. soc. **34**, 1424. 1912.

zahl abgelesen, sodann von allen Werten das Mittel genommen. Späterhin benutzten wir nicht das Colorimeter, sondern stellten mehrere Vergleichsröhrchen mit der Lauge und fein abgestufter Farbstoffmenge her und suchten das genau farbgleiche Röhrchen aus dieser Reihe heraus. Abstufungen des Farbstoffgehaltes von 10% des Gesamtwertes gestatteten noch eine schätzungsweise Interpolation. Wir möchten diese Methode derjenigen mit dem Colorimeter noch vorziehen. Die Tabellen zeigen die Ergebnisse in praktisch salzfreien wie in salzhaltigen Lösungen. Die Dissoziationskonstanten, die sich aus den einzelnen Messungen ergeben, sind in der letzten Columne verzeichnet. p_K bedeutet — log K. Die erhaltenen Werte stimmen mit denen in der Literatur, soweit sie vorhanden sind, gut überein. In den Versuchen mit Salzzusatz bedeutet p_K den scheinbaren, durch die Salzverschiebung erzeugten Wert (s. das Kapitel: Theorie des Salzfehlers). Die Messungen werden alle bei 17—18° ausgeführt.

Tabelle II.

β-Dinitrophenol ($OH : NO_2 : NO_2 = 1 : 2 : 6$).

Die letzte Spalte ist berechnet nach $k = h \cdot \frac{F}{1 - F}$; ebenso in allen folgenden Tabellen. F bedeutet den Färbegrad.

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	F	p_k
$^1/_5$ d. gesätt. Lösung	HCl	—	—	—	2,10	0,028	3,64
$^1/_5$ "	CH_3COOH	—	—	—	2,41	0,048	3,71
$^1/_{10}$ "	"	—	—	—	2,41	0,05	3,64
$^1/_{10}$ "	"	—	—	—	2,87	0,13	3,70 } aus den salzarmen Versuchen Mittel 3,69
$^1/_{10}$ "	"	—	—	—	3,37	0,37	3,60
$^1/_{10}$ "	"	—	—	—	3,87	0,53	3,82
$^1/_{10}$ "	Acetat	$^n/_{40}$	—	—	4,10	0,70	3,73
$^1/_{10}$ "	Essigsäure	—	NaCl	0,5 n	2,37	0,060	**3,57**
$^1/_{20}$ "	Acetat	$^n/_{40}$	"	0,5 n	3,51	0,575	**3,59**
$^1/_{20}$ "	"	$^n/_{40}$	"	0,85%	3,00	0,225	**3,50**
$^1/_{20}$ "	"	$^n/_{40}$	"	0,85%	3,31	0,343	**3,60**
$^1/_{20}$ "	"	$^n/_{400}$	KCl	0,5 n	3,02	0,35	**3,29**
$^1/_{20}$ "	Essigsäure	—	"	0,5 n	3,52	0,56	**3,40**
$^1/_{10}$ "	HCl	—	$CaCl_2$	1,2 m	0,69	0,01	*2,69*
$^1/_{10}$ "	"	—	"	1,2 m	1,36	0,028	*2,91*
$^1/_{10}$ "	Essigsäure + HCl	—	"	1,2 m	1,98	0,075	*3,08*
$^1/_{10}$ "	"	—	"	1,2 m	2,00	0,07	*3,12*
$^1/_{10}$ "	Essigsäure	—	"	1,2 m	2,39	0,18	*3,04*
$^1/_{10}$ "	Acetat	$^n/_{1000}$	"	1,2 m	2,84	0,316	*3,16*
$^1/_{10}$ "	"	$^n/_{200}$	"	1,2 m	3,27	0,67	*2,95*
$^1/_{10}$ "	"	$^n/_{100}$	"	1,2 m	3,60	0,79	*2,70*
$^1/_{10}$ "	"	$^n/_{50}$	"	1,2 m	4,00	1,0	—
$^1/_{10}$ "	"	$^n/_{20}$	"	1,2 m	4,21	1,0	—
$^1/_{10}$ "	Essigsäure	—	"	0,6 m	2,63	0,21	—
$^1/_{10}$ "	"	—	Pepton	1%	3,83	0,63	—

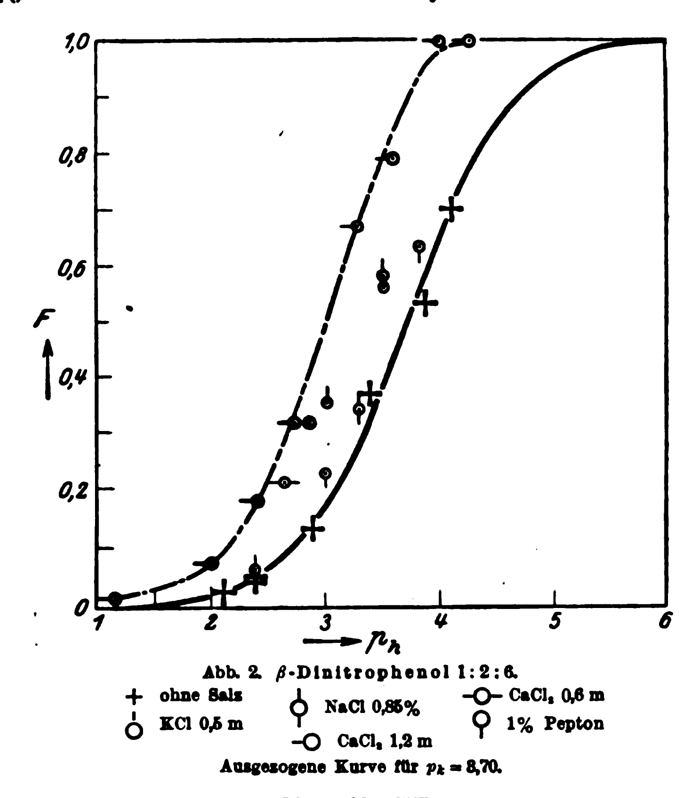


Abb. 2. β-Dinitrophenol 1:2:6.
+ ohne Salz; KCl 0,5 m; NaCl 0,85%; CaCl₂ 1,2 m; CaCl₂ 0,6 m; 1% Pepton
Ausgezogene Kurve für p_k = 3,70.

Tabelle III.

α-Dinitrophenol ($OH : NO_2 : NO_2$ = 1:2:4).

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in derselben	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)	
1/10 d. gesätt. Lösung	Essigsäure	—	—	—	2,42	0,015	4,22	Mittel 4,06
1/10 "	Acetat	n/200	—	—	3,48	0,21	4,05	
1/10 "	"	n/80	—	—	3,88	0,40	4,06	
1/10 "	"	n/40	—	—	4,18	0,59	4,01	
1/10 "	"	n/25	—	—	4,57	0,80	3,97	
1/10 "	"	n/17	—	—	4,94	0,88	4,07	
1/10 "	"	n/200	KCl	0,5 n	3,55	0,28	**4,12**	
1/10 "	"	n/160	"	0,5 n	3,72	0,43	—	
1/10 "	Acetat	n/60	"	0,5 n	4,06	0,55	**3,96**	
1/10 "	"	n/40	"	0,5 n	4,12	0,57	**3,98**	
1/10 "	"	n/35	"	0,5 n	4,42	0,81	**3,80**	
1/10 "	"	n/30	"	0,5 n	4,53	0,84	**3,81**	
1/10 "	"	n/50	NaCl	0,85%	2,98	0,10	—	
1/10 "	"	n/200	KCl	1%	3,61	0,32	**3,95**	
1/10 "	Essigsäure	—	$CaCl_2$	0,6 m	2,16	0,027	*3,73*	
1/10 "	Acetat	n/1000	"	0,6 m	2,85	0,10	*3,80*	

Tabelle III (Fortsetzung).

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)
$^1/_{10}$ d. gesätt. Lösung	Acetat	$^n/_{200}$	$CaCl_2$	0,6 m	3,09	0,20	*3,69*
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{60}$	,,	0,6 m	3,60	0,45	*3,69*
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{25}$	,,	0,6 m	3,63	0,46	*3,70*
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{30}$	,,	0,6 m	4,05	0,85	
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{17}$	,,	0,6 m	4,54	0,97	
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{200}$	$AlCl_3$	0,05 m	3,01	0,12	
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{100}$	,,	0,05 m	3,22	0,17	
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{40}$	,,	0,05 m	3,43	0,26	
$^1/_{10}$,,	,,	$^n/_{25}$	,,	0,05 m	3,72	0,37	
$^1/_{10}$,,	Essigsäure	—	Eucupinotoxin	1‰	3,27	0,56	**3,15!**
$^1/_{10}$,,	Acetat	$^n/_{40}$	,,	1‰	4,67	1,05	
$^1/_{10}$,,	Salzsäure	—	Optochin	2%	1,81	0,00	
$^1/_{10}$,,	,,	—	,,	2%	2,19	0,075	**3,29!**
$^1/_{10}$,,	Essigsäure	—	,,	2%	3,36	0,50	**3,36!**
$^1/_{10}$,,	Salzsäure	—	,,	2%	3,39	0,57	**3,25!**
$^1/_{10}$,,	Essigsäure	—	,,	2%	4,18	1,00	< 3!
$^1/_{10}$,,	Acetat	$^n/_{200}$	,,	2%	4,28	1,00	

Abb. 8. α-Dinitrophenol 1:2:4.

+ ohne Salz. — KCl 0,5 m. — NaCl 0,5 m. — KCl 0,14 m. — Na_2SO_4 0,25 m. — $CaCl_2$ 0,6 m. — × $AlCl_3$ 0,05 m. — ⊗ $AlCl_3$ 0,5 m. — Optochin 2% — Eucupinotoxin 1‰ — △ K_2SO_4 0,25 m.

Ausgezogene Kurve: theoretisch berechnet für $p_k = 4,07$, punktierte für KCl 0,5 m gestrichelte für $CaCl_2$ 0,8 m.

Tabelle IV.

Phenophthalein.

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)	
0,04°/₀₀	Borat	n/20	—	—	8,47	0,015	10,39	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	8,75	0,056	9,97	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	9,11	0,16	9,83	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	9,20	0,20	9,80	Mittel 9,72
0,04°/₀₀	"	"	—	—	9,37	0,30	9,73	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	9,50	0,40	9,68	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	9,70	0,52	9,66	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	10,05	0,66	9,76	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	10,43	0,85	9,68	
0,04°/₀₀	"	"	—	—	11,37	1,00		
0,04°/₀₀	"	"	NaCl	0,5 n	8,51	0,04		
0,04°/₀₀	"	"	KCl	0,5 n	8,86	0,14		
0,04°/₀₀	"	n/100	"	0,5 n	8,93	0,17		
0,04°/₀₀	"	n/20	"	0,5 n	9,84	0,73		

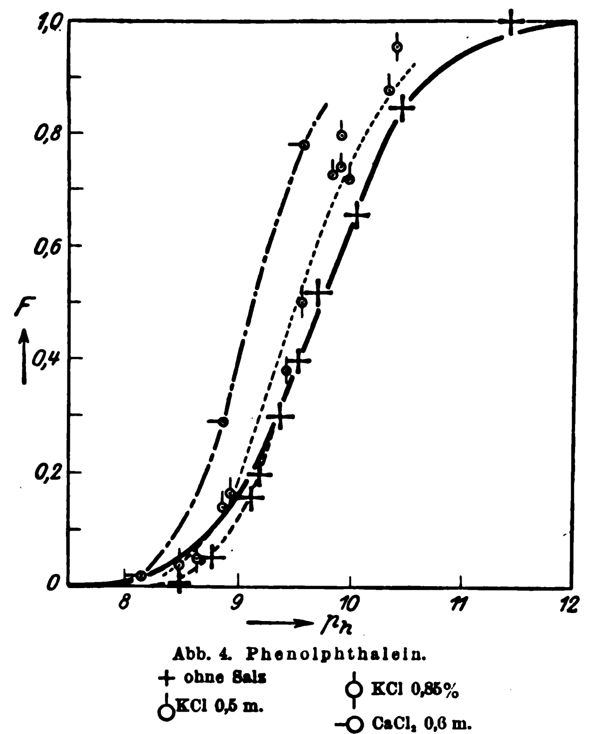


Abb. 4. **Phenolphthalein.**

+ ohne Salz — Kreis mit senkrechtem Strich KCl 0,85% — Kreis mit Strich KCl 0,5 m. — Kreis mit waagerechtem Strich CaCl₂ 0,6 m.

Ausgezogene Kurve = theoretische Kurve für p_k = 9,7, rechte gestrichelte Kurve: die praktische Abweichung von der vorigen; mittlere gestrichelte Kurve die praktische Kurve für 0,5 m KCl; linke gestrichelte Kurve für 0,6 m $CaCl_2$.

Tabelle IV (Fortsetzung).

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)
0,04‰	Borat	$^n/_{50}$	KCl	0,5 n	9,91	0,80	
0,04‰	"	$^n/_{20}$	"	0,5 n	10,33	0,88	
0,04‰	"	$^n/_{20}$	NaCl	1%	8,66	0,05	
0,04‰	"	"	KCl	1% (physiol.)	9,43	0,38	
0,04‰	"	"	"	1%	9,56	0,50	
0,04‰	"	"	"	1%	9,89	0,74	
0,04‰	"	"	"	1%	9,99	0,72	
0,04‰	"	"	"	1%	10,40	0,96	
0,04‰	"	"	$CaCl_2$	0,6 m	8,14	0,02	
0,04‰	"	"	"	0,6 m	8,86	0,29	
0,04‰	"	"	"	0,6 m	9,56	0,78	

Tabelle V.

p-Nitrophenol.

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)
0,014‰	Phosphat	$^n/_{30}$	—	—	4,66	0,00	
0,2‰	Acetat	$^n/_{20}$	—	—	5,31	0,014	7,16
0,2‰	"	$^n/_{20}$	—	—	5,37	0,016	7,16
0,2‰	"	$^n/_{20}$	—	—	5,62	0,032	7,11
0,014‰	Phosphat	$^n/_{30}$	—	—	6,27	0,11	7,18
0,04‰	"	$^n/_{150}$	—	—	6,36	0,13	7,19
0,2‰	"	$^n/_{25}$	—	—	6,37	0,14	7,15
0,014‰	"	$^n/_{30}$	—	—	6,51	0,16	7,23
0,2‰	"	$^n/_{25}$	—	—	6,58	0,20	7,18
0,014‰	Kakodylat	$^n/_{100}$	—	—	6,76	0,27	7,19
0,04‰	Phosphat	$^n/_{150}$	—	—	6,78	0,29	7,17
0,014‰	"	$^n/_{30}$	—	—	6,99	0,40	7,17
0,2‰	"	$^n/_{20}$	—	—	7,03	0,42	7,17
0,2‰	"	$^n/_{20}$	—	—	7,14	0,47	7,19
0,014‰	Kakodylat	$^n/_{40}$	—	—	7,20	0,45	7,29
0,2‰	Phosphat	$^n/_{15}$	—	—	7,50	0,73	7,00
0,014‰	Kakodylat	$^n/_{100}$	—	—	7,59	0,68	7,27
0,2‰	Phosphat	$^n/_{15}$	—	—	7,60	0,68	7,27
0,04‰	"	$^n/_{150}$	—	—	7,62	0,76	7,12
0,014‰	Kakodylat	$^n/_{100}$	—	—	7,66	0,75	7,18
0,014‰	Phosphat	$^n/_{30}$	—	—	7,86	0,87	7,03
0,04‰	"	$^n/_{150}$	—	—	7,88	0,80	7,28
0,04‰	"	$^n/_{150}$	—	—	7,90	0,85	7,15
0,04‰	"	$^n/_{150}$	—	—	8,71	0,97	7,20
0,04‰	"	$^n/_{150}$	KCl	1 n	6,41	0,17	
0,014‰	"	$^n/_{30}$	"	1 n	6,83	0,35	
0,04‰	"	$^n/_{150}$	"	1 n	6,95	0,44	
0,04‰	"	$^n/_{150}$	"	1 n	6,96	0,45	
0,04‰	"	$^n/_{150}$	"	1 n	7,26	0,53	

Mittelwert p_k = 7,176 (for the p_k values 7,16 to 7,20)

Tabelle V (Fortsetzung).

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Farbegrad
0,04‰	Phosphat	n/150	KCl	1 n	7,27	0,50
0,014‰	"	n/30	"	1 n	7,38	0,60
0,2‰	"	n/20	"	0,5 n	6,67	0,25
0,2‰	"	n/15	"	0,5 n	7,07	0,43
0,2‰	"	n/15	"	0,5 n	7,38	0,56
0,2‰	"	n/15	"	0,5 n	7,86	0,79
0,2‰	Kakodylat	n/100	$CaCl_2$	0,6 m	5,81	0,081
0,014‰	"	n/200	"	0,6 m	6,07	0,12
0,2‰	"	n/60	"	0,6 m	6,16	0,14
0,014‰	"	n/120	"	0,6 m	6,21	0,14
0,014‰	"	n/120	"	0,6 m	6,39	0,24
0,014‰	"	n/100	"	0,6 m	6,59	0,29
0,2‰	"	n/50	"	0,6 m	6,64	0,39
0,014‰	"	n/100	"	0,6 m	6,79	0,38
0,014‰	"	n/100	"	0,6 m	6,99	0,60
0,2‰	"	n/50	"	0,6 m	7,04	0,58
0,014‰	"	n/100	"	0,6 m	7,19	0,63
0,014‰	"	n/70	Pepton	1%	6,70	0,30
0,014‰	"	n/50	"	1%	7,14	0,54
0,014‰	Acetat	n/20	Casein	1%	5,57	0,027

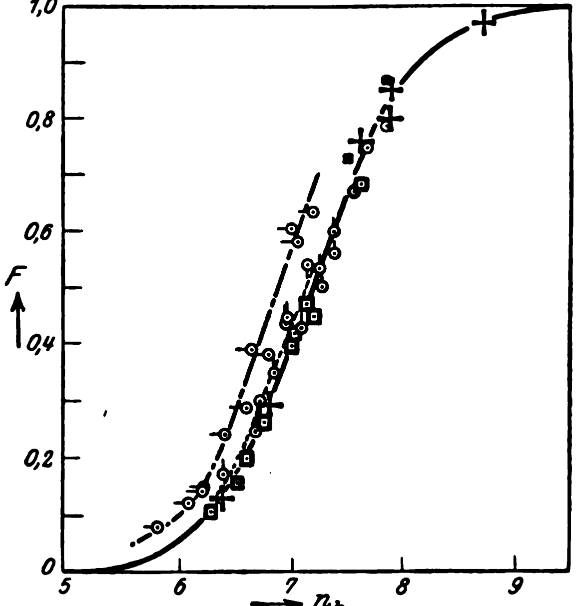


Abb. 5. p-Nitrophenol. Abscisse: p_H (elektrometrisch gemessen) Ordinate: Farbgrad. + dünnes Phosphatgemisch, Kationengehalt ca. n/150. ⊠ stärkeres Phosphatgemisch, Kationengehalt etwa n/30. O Kakodylatpuffer. KCl 0,5 m. –O $CaCl_2$ 0,6 m. 1% Pepton.

Ausgezogene Kurve = theoretisch berechnet für p_k = 7,18. Die punktierte Kurve ist schätzungsweise die Kurve bei Gegenwart von 0,5 m KCl; die gestrichelte die für 0,6 m $CaCl_2$.

Tabelle VI.

m-Nitrophenol.

Konzentration des Indicators	Puffer	Konzentr. d. Kationen in demselb.	Zugefügtes Salz	Dessen Konzentration	p_H	Färbegrad	p_k (berechnet)	
0,3°/oo	Phosphat	n/120	—	—	6,70	0,02	8,39	Mittel 8,35
0,3°/oo	"	n/100	—	—	6,82	0,03	8,30	
0,6°/oo	"	n/30	—	—	7,09	0,054	8,34	
0,6°/oo	"	n/30	—	—	7,26	0,075	8,36	
0,3°/oo	Borat	n/120	—	—	7,66	0,19	8,29	
0,3°/oo	"	n/100	—	—	8,03	0,33	8,34	
0,3°/oo	"	n/50	—	—	8,55	0,62	8,34	
0,3°/oo	"	n/400	KCl	0,5 n	7,05	0,08		
0,3°/oo	"	n/100	"	0,5 n	7,81	0,33		
0,3°/oo	Phosphat	"	NaCl	0,5 n	6,88	0,042		
0,3°/oo	"	"	"	0,5 n	7,26	0,125		
0,3°/oo	"	"	"	0,85%	7,16	0,065	**8,35**	
0,3°/oo	"	"	"	0,85%	7,32	0,088	**8,38**	
0,3°/oo	"	"	"	0,85%	7,57	0,142	**8,35**	
0,3°/oo	Borat	"	$CaCl_2$	0,6 m	7,10	0,11		

Abb. 6. m-Nitrophenol.

+ ohne Salz. —O $CaCl_2$ 0,6 m.
KCl 0,5 m. NaCl 0,5 m.
NaCl 0,85%.

Ausgezogene Kurve für p_k = 8,35.

Tabelle VII.

m-Nitrobenzolazosalicylsäure.

Konzentration des Indicators	Puffer-gemisch	Konzentr. d. Kationen i. demselben	p_H elektrom.	F colorim.	p_k berechnet*)
1/10 d. Stammlösung	Glykokoll	m/15	9,60	0,11	(10,95)
1/10 "	Borat	m/20	9,75	0,14	(10,84)
1/10 "	"	m/25	9,83	0,11	11,18
1/10 "	Glykokoll	m/15	10,30	0,17	11,22
1/10 "	Borat	m/20	10,36	0,21	11,11
1/10 "	"	m/15	10,51	0,28	11,04
1/10 "	"	m/15	10,56	0,33	10,98
1/10 "	Glykokoll	m/15	10,61	0,30	11,09
1/10 "	Borat	m/25	10,76	0,38	11,06
1/10 "	"	m/20	10,94	0,38	11,25
1/10 "	Glykokoll	m/15	10,94	0,43	11,14
1/10 "	"	m/15	11,16	0,50	11,24
1/10 "	"	m/15	11,53	0,69	11,23
1/10 "	Borat	m/25	11,77	0,82	11,15
				Mittel:	**11,14**

*) Nach der Formel: $h = k \cdot \frac{1-F}{F-0{,}07}$ (s. S. 185).

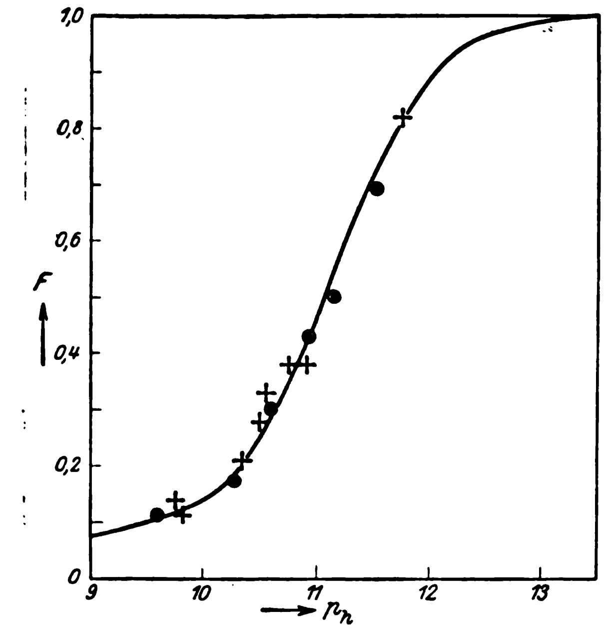


Abb. 7. m-Nitrobenzolazosalicylsäure.
+ Borat.
O Glykokoll.
Die Kurve ist nach der unter Tabelle VII angegebenen Formel berechnet, für p_k = 11,14.

Versuche mit Salzzusatz wurden mit diesem Farbstoff nicht angestellt.

Was den Salzfehler betrifft, so sehen wir zunächst, daß er für verschiedene Indicatoren verschieden groß ist. Für die praktisch wichtigen Konzentrationen, nämlich physiologische Salzlösung und 0,5 n (etwa Meerwasserkonzentration) sind die aus diesen Versuchen sich ergebenden Mittelwerte in der Tabelle XXII (S. 207) zusammengestellt. Besonders angenehm ist es, daß die beiden Indicatoren, welche das biologisch wichtigste Gebiet umfassen, (p- und m-Nitrophenol) einen so kleinen Salzfehler haben, daß er für physiologische Salzlösungen ohne Bedenken vernachlässigt werden kann. Wir möchten noch hinzufügen, daß auch genuines Serumalbumin sowie Peptone (Nährbouillon) wie auch Casein und Gelatine für diese Indicatoren in der Regel keine meßbaren Fehler machen.

Zweitens sehen wir aus diesen Kurven, daß die durch die zweiwertigen Ca-Ionen hervorgerufenen Salzfehler mit dem p_H ein wenig variieren. Die Kurven des Farbgrades bei Gegenwart von Ca, welche gestrichelt gezeichnet sind, verlaufen sichtlich nicht ganz parallel den ursprünglichen.

In den Versuchen sind auch einige Stichproben für Salze angegeben worden, bei deren Kationen man eine größere Bindungsfähigkeit an den Farbstoff vermuten konnte (Optochin und Eucupinotoxin). Diese rufen, wie dies nicht anders erwartet werden konnte, viel größere Salzfehler hervor.

Derartige Körper werden in Zukunft vielleicht geeignet sein, um die früher entwickelte Theorie der Dissoziation von Säuren bei Gegenwart von Salzen besser zu studieren, weil die Ausschläge viel größer sind als bei gewöhnlichen Salzen. Für die Zwecke dieser Arbeit genügt aber dieser Hinweis. Die Theorie des Salzfehlers wird im folgenden Abschnitt abgehandelt werden.

Eine besondere Besprechung erfordert zunächst das Phenolphthalein. Dies ist der einzige einfarbige Indicator, bei dem der Dissoziationszustand auf einer mit der unseren vergleichbaren colorimetrischen Weise quantitativ schon früher gemessen worden ist.

Hildebrand bestimmte unter Benutzung eines Spektrophotometers die Dissoziationskonstante des Phenolphthaleins und fand, daß man sie bei verhältnismäßigem Überschuß von NaOH gut bestimmen kann ($1{,}7 \cdot 10^{-10}$). Bei weiterer Abnahme der NaOH zeigte diese Konstante jedoch einen Gang. Dies wurde von Wegscheider folgendermaßen gedeutet. Phenolphthalein bildet farblose einbasische Salze, erst die zweibasischen Salze

sind rot. Diese verschiedenen Salze wurden von Kober und Marshall[1]) dargestellt. Sie unterscheiden farblose einbasische, rote zweibasische und farblose dreibasische Salze.

Bei der „Vergleichslösung“ in unserem Sinne darf man daher beim Phenolphtalein nicht eine so starke Laugenkonzentration nehmen, daß sich etwas von dem dreibasischen Salz bildet. Eine 0,01-normale Natronlauge ist die empfehlenswerteste Konzentration. Da nun die Existenz farbloser einbasischer Salze ebenfalls eine Abweichung von der gewöhnlichen Dissoziationskurve in dem ganz schwach alkalischen Gebiet hervorruft, so kann man die für die gewöhnlichen Indicatoren geltenden Formeln und Diagramme zur Bestimmung von p_H nicht anwenden. Abb. 4 zeigt, wie die Kurve in ihrem unteren Teil von der theoretischen Kurve mehr und mehr abweicht. Die Werte sind aber gut reproduzierbar, für die Salzfehler gilt ähnliches, wie für die anderen Indicatoren. Die Beziehung zwischen dem Färbegrad und p_H wird daher am einfachsten auf Grund der empirischen Kurve (Abb. 4) durch eine Tabelle (S. 206, Tab. XX) wiedergegeben, welche bei der praktischen Anwendung für Phenolphthalein benutzt werden muß. Der Umstand, daß die Kurve für Phenolphthalein unten steiler als gewöhnlich verläuft, bewirkt, daß das Anwendungsbereich des Phenolphthalein nach der sauren Seite zu etwas enger ist, als bei den anderen Indicatoren. Das schadet aber nichts, weil das fehlende Gebiet vom m-Nitrophenol gut überspannt wird, und andererseits ist eine Versteilerung der Kurve für die Empfindlichkeit sogar von Vorteil.

Aus den noch keinen Gang zeigenden Werten ergibt sich $p_k = 9{,}72$. Der entsprechende Wert von Wegscheider ist 9,75, von Hildebrand 9,77.

In der Literatur finden sich Angaben, daß schon wenig Alkohol die Farbtiefe des Phenolphthaleins stark beeinflusse[2]). Diese Autoren arbeiteten nun immer mit einem Puffer von $NH_3 + NH_4Cl$. Die Beobachtung an sich kann leicht bestätigt werden. In anderen Puffern (Borat, Glykokoll) ist die Wirkung des Alkohols auf den Farbgrad des Phenolphthaleins aber viel geringer. Man kann daraus schließen, daß die Wirkung des Alkohols sich nicht

---

[1]) l. c.

[2]) Hildebrand, l. c.; Mc. Coy, Amer. Journ. 31, 508. 1904; siehe auch Bjerrum, Theorie d. alkalim. usw. Titration, l. c., S. 36.

allein auf das Phenolphthalein erstreckt, sondern, daß der Alkohol die Dissoziationskonstante des NH_3 stärker beeinflußt als die der Grundsubstanzen anderer Pufferarten. Wir glauben nicht, daß die bei unserer Versuchsanordnung, bei der wir von alkoholischen Stammlösungen des Phenolphthaleins ausgehen, und bei der eine definitive Alkoholkonzentration von höchstens etwa 3% entsteht, ein merklicher Fehler entstehen kann, zumal diese Alkoholkonzentration stets annähernd die gleiche ist.

Ferner muß das Salicylgelb besonders besprochen werden. Was uns veranlaßte, diesen Körper darzustellen und in ihm das fehlende Glied unserer Indicatorreihe zu suchen, war folgendes. Unter den von Sörensen empfohlenen Indicatoren des stark alkalischen Gebiets befindet sich p-Nitrobenzolazosalicylsäure (Alizaringelb R), brauchbar von $p_H = 10{,}1$ bis 12,1. Dieser Farbstoff ist in stark alkalischer Lösung rot und geht bei Ansäuerung durch eine gelbe Zwischenstufe in farblos über. Da nun beim Nitrophenol die p-Verbindung eine viel tiefere Färbekraft hat, als die m-Verbindung, so durfte etwas Analoges auch für die Nitrobenzolazosalicylsäure erwartet werden. Das bestätigte sich. Die tiefrote Farbe der 2. Dissoziationsstufe der p-Verbindung ist bei der m-Verbindung nur gelb, und die gelbe Farbe der 1. Stufe geht in ein unscheinbares Hellgelb zurück, so daß der Indicator nahezu wie ein einfarbiger behandelt werden kann. Jedenfalls haben wir den Vorteil, daß die 1. Dissoziationsstufe in ihrer Nuance mit der zweiten bei entsprechender Verdünnung so gut übereinstimmt, daß die Colorimetrie nicht wesentlich durch eine Änderung der Nuance gestört wird. Nur ist die untere Grenze des Indicators bei $p_H < 10$ nicht eine farblose Stufe, sondern eine hellgelbe Stufe, welche sich von der maximalen Färbung kaum in der Nuance unterscheidet, sondern nur dadurch, daß ihre Farbtiefe 0,07 der maximalen beträgt, wie die Farbvergleichung zeigte. Eine einfache Berechnung ergibt für diesen Fall

$$h = k\frac{1-F}{F-0{,}07},$$

wo k die Dissoziationskonstante der 2. Stufe bedeutet. Diese Formel können wir benutzen, um aus der Farbgradkurve k zu berechnen. Es ergibt sich $p_k = 11{,}14$. In der Praxis werden wir p_H nicht nach dieser Formel berechnen, sondern geben hierfür eine Tabelle. (Tab. XXI, S. 206).

Es ist interessant, daß unter den einbasischen Indicatorsäuren kein Indicator gefunden werden konnte mit einer kleineren Konstante als m-Nitrophenol. Es sei noch erwähnt, daß o-Vanillin als Indicator fast die gleichen Eigenschaften wie m-Nitrophenol hat, es hat aber keine Vorteile vor diesem. Sehr ähnlich ist auch Protocatechualdehyd, der sich aber in alkalischer Lösung bald verfärbt. Um Indicatoren mit noch schwächeren Säurekonstanten zu erhalten, muß man in das Molekül ein weiteres stärkeres Säureradikal zufügen, z. B. COOH; dadurch wird die saure Natur der OH-Gruppe, welche nunmehr erst in der 2. Dissoziationsstufe zum Vorschein kommt, herabgedrückt. Ist diese 2. Stufe die gefärbte und die erste ganz oder nahezu farblos, so erfüllt der Indicator die geforderten Bedingungen. Nach diesem Prinzip ist von unseren Indicatoren Phenolphthalein und Salicylgelb konstituiert.

Der Anwendungsbereich der Indicatoren.

Theoretisch ist jeder Indicator für jede beliebige h brauchbar, aber praktisch ist dem Anwendungsbereich eine obere und untere Grenze gesetzt. Die eine Grenze ergibt sich dadurch, daß die Annäherung an die maximale Farbstärke asymptotisch erfolgt; die Dissoziationskurve verläuft hier praktisch horizontal und die Farbtiefe wird praktisch unabhängig von der h; aber schon ein Stück vor dem horizontalen Kurvenaste ist die Messung ungenau. Ein Fehler in der colorimetrischen Abschätzung der Farbe von nur 5% kann einen Fehler im p_H von 0,2—0,3 ergeben. Je mehr wir uns dem mittleren schrägen Teil der Kurve nähern, um so geringer werden die Fehlergrenzen. In der Mitte der Kurve bewirkt ein colorimetrischer Fehler von 5% einen Fehler im p_H von etwa 0,1. In der Gegend der Dissoziationskurve, wo sie ihre untere Krümmung hat, bewirkt der gleiche Fehler einen Fehler im p_H von höchstens 0,05. Im weiteren Verlauf, wo die Kurve wieder horizontaler wird, wird sie im Gegensatz zu ihrem oberen horizontalen Ast noch besser brauchbar. Für einen Färbegrad von 0,01 würde ein Fehler von 5% einen Fehler im p_H von etwa 0,02 bedeuten, und für einen Färbegrad von 0,001 ist der Fehler eher noch kleiner. Jedoch wird dieses extreme Gebiet ($F <$ etwa 0,003) aus einem anderen Grunde praktisch unbequem. Um für das Auge bequeme Farbstärken zu erreichen, müßte man sehr große Farbstoffmengen anwenden. Hierin ist man aber aus verschiedenen Gründen beschränkt. Erstens sind die meisten Indicatoren in ihrer undissoziierten Form nur beschränkt wasserlöslich, ferner läuft man Gefahr, durch allzu reichlichen Zusatz die

zu messende h selbst zu ändern. Auf diese Weise ergibt sich als wirklich brauchbares Anwendungsgebiet jedes Indicators der Bereich von p_H zwischen den Farbgraden 0,01 und 0,8, oder mit anderen Worten zwischen $p_H = p_k - 2$ und $p_H = p_k + 0{,}3$, wo p_k den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstante des Indicators bedeutet. Oft ist auch ein Färbegrad unterhalb 0,01 noch sehr gut anwendbar. Das wirklich brauchbare Gebiet jedes Indicators umspannt demnach mehr als 2 Zehnerpotenzen. Am genauesten ist die Zehnerpotenz zwischen $p_k - 2$ und $p_k - 1$. Auf diese Weise ergeben sich als bestes Anwendungsbereich die oben in der Tabelle (S. 169, Tab. I) angeführten Werte.

III. Theorie des Salzfehlers der Indicatoren.

Die bisherige Theorie hat zur Voraussetzung, daß andere Ionen, außer denen des Indicators und den H-Ionen in der Lösung nicht oder jedenfalls in einer nicht wirksamen Konzentration vorhanden sind. Trifft diese Bedingung nicht zu, so zeigen sich Abweichungen von der Theorie. Diese sind es offenbar, welche man unter dem allgemeinen Begriff des Salzfehlers zusammenfassen kann. Die Theorie des Salzfehlers hat ein Interesse, welches weit über dem Rahmen der Indicatorfrage hinausgeht. Die große biologische Bedeutung dieser Erscheinung soll uns Veranlassung sein, die Theorie des Salzfehlers genauer zu erörtern. Wie schon Bjerrum[1]) hervorgehoben hat, sind von vornherein zwei Möglichkeiten vorhanden, um den Salzfehler zu erklären. Entweder kann man annehmen, daß der Indicator mit dem Kation eines hinzugefügten Neutralsalzes teilweise undissoziiertes Salz bildet, d. h. mit anderen Worten, daß das Salz den Gleichgewichtszustand der verschiedenen Modifikationen des Indicators verschiebt. Oder man kann annehmen, daß ein Neutralsalz die Dissoziationskonstante des Indicators verändert. Eine dritte Möglichkeit kommt nur für kolloide Indicatoren in Betracht: Änderung des Dispersitätsgrades durch die Salze.

I. Erörtern wir zunächst die erste Möglichkeit. Welcher Art die Verschiebungen des Gleichgewichtszustandes des Indicators in diesem Falle sind, darüber geben die theoretischen Unter-

[1]) N. Bjerrum, Die Theorie der acidi- und alkalimetrischen Titrationen. Stuttgart 1914.

suchungen von Michaelis[1]) Aufschluß. Wenn wir aus diesen theoretischen Untersuchungen das herausheben wollen, was für uns von Wichtigkeit ist, so können wir das folgendermaßen zusammenfassen:

a) Für den Salzfehler darf maßgeblich sein nur das Kation des zugefügten Salzes, wenn der Indicator eine Säure ist. (Ist der Indicator eine Base, so ist es umgekehrt das Anion des Salzes.) Die Natur oder Wertigkeit des Anions muß ganz belanglos sein. 2. Ist das fremde Kation einwertig und wird es in konstanter Konzentration gehalten, während die h durch schwache Pufferlösungen variiert sind, so besteht sein Einfluß auf die Dissoziationskurve ausschließlich darin, daß es dieselbe horizontal verschiebt.

Bezeichnen wir den numerischen Wert der Abszisse für die Ordinate 0,5 als den Parameter der Dissoziationskurve, so ist bei Abwesenheit von Salzen dieser Parameter gleich der Dissoziationskonstante der Säure. Der Parameter der durch Salze verschobenen Kurven hat eine andere Bedeutung, welche sich folgendermaßen ergibt. Ohne Salze gilt die Beziehung

$$\varrho = \frac{1}{1 + \frac{k_a}{h}},$$

$$\alpha = 1 - \varrho = \frac{1}{1 + \frac{h}{k_a}}. \qquad \text{(I)}$$

Bei Gegenwart von Salzen mit einwertigem Kation gilt die Beziehung

$$\varrho = \frac{k_l h}{k_l h + k_a i + k_a k_l},$$

wo k_a die Dissoziationskonstante der Säure, k_l diejenige des Salzes dieser Säure mit dem Kation, i die Konzentration der freien Kationen des zugefügten Salzes bedeutet. Dies können wir umformen in

$$\varrho = \frac{1}{1 + \frac{k_a}{h}\left(\frac{i}{k_l} + 1\right)},$$

also

$$\alpha = 1 - \varrho = \frac{1}{1 + \frac{h}{k_a\left(\frac{i}{k_l} + 1\right)}}. \qquad \text{(II)}$$

Die Gleichungen I und II unterscheiden sich also nur dadurch, daß die konstante Größe k_a (in I) ersetzt ist durch die Größe $k_a\left(\frac{i}{k_l} + 1\right)$. Diese Größe stellt also den Parameter der Kurven bei Salzgegenwart dar.

---

[1]) Michaelis, Diese Zeitschr. 103, 225. 1920

Somit können wir auch die Dissoziationskonstante k_I berechnen. Wir lesen den Abszissenpunkt für die Ordinate 0,5 ab, betrachten diesen Wert als negativen Logarithmus einer Größe q, alsdann ist

$$q = k_a\left(\frac{i}{k_I} + 1\right) \quad \text{oder}$$

$$k_I = \frac{k_a i}{q - k_a} . \qquad \text{(III)}$$

Wir wollen die Rechnung hier an einem Beispiel durchführen. Für α-Dinitrophenol ergibt sich (s. Abb. 3) bei Abwesenheit von Salzen $p_k = 4{,}07$, also $k_a = 8{,}5 \cdot 10^{-5}$. Bei Gegenwart von 0,5 m KCl ($i = 0{,}5$) ergibt sich $p_q = 3{,}87$, also $q = 1{,}35 \cdot 10^{-4}$. Folglich nach (III)

$$k_I = \frac{8{,}5 \cdot 10^{-5} \cdot 0{,}5}{1{,}35 \cdot 10^{-4} - 8{,}5 \cdot 10^{-5}} = 0{,}85 .$$

Dieser Wert würde natürlich der Wirklichkeit bloß in dem Falle entsprechen, wenn die Verschiebung der Kurve ausschließlich auf Salzbildung beruhen würde, was, wie wir sogleich sehen werden, nicht zutrifft. Wir wollten bloß zeigen, wie die Rechnung gegebenenfalls zu führen ist.

b) Ist nun das fremde Kation zweiwertig, so besteht nach Michaelis[1]) der Einfluß derselben nicht in einer einfachen Horizontalverschiebung, sondern die Kurve wird gleichzeitig versteilert, oder mit anderen Worten, der Salzfehler ist bei einer gegebenen Konzentration dieser Kationen nicht konstant, sondern er wird mit steigendem p_H größer.

II. Die zweite Möglichkeit der Erklärung des Salzfehlers besteht darin, daß man dem Salz einen Einfluß auf die Dissoziationskonstante des Indicators zuschreibt. Diese Auffassung wird nahegelegt durch Untersuchungen von Arrhenius[2]), welcher zeigte, daß die Dissoziationskonstante schwacher Säuren durch Neutralsalze vergrößert wird. Diese Annahme von Arrhenius erscheint nun durch die neue Ionenaktivitätstheorie von Niels Bjerrum[3]) in einem neuen Licht. Bjerrum hat die Theorie, aufgestellt, daß die sog. ganz starken Elektrolyte in allen Konzentrationen immer praktisch total dissoziiert sind und daß ihre scheinbare unvollkommene Dissoziation auf einer fehlerhaften Deutung von Zahlen beruht, die man aus Messungen der Leitfähigkeit, des osmotischen Druckes und der elektromotorischen Kraft erhalten hat. Das folgt schon daraus, daß der Dissoziations-

---

1) Michaelis, Diese Zeitschr. 106, 83. 1920.
2) Arrhenius, Zeitschr. f. physikal. Chemie 31, 197. 1899.
3) Bjerrum, Zeitschr. f. Elektrochemie 24, 321. 1918. — Meddelande från k. vetenskaps Akad. Nobelinst. 5, Nr. 5. 1919.

grad einer gegebenen Salzlösung sich aus jeder dieser drei Methoden verschieden berechnet. Bjerrum nimmt an, daß die aktive Masse eines Ions infolge elektrostatischer Einflüsse geringer ist als die eines unelektrischen Moleküls bei gleicher Konzentration. Unter aktiver Masse soll dabei verstanden werden diejenige Masse, welche man bei chemischen Gleichgewichtsrechnungen in die Formel des Massenwirkungsgesetzes und bei Potentialmessungen in die Nernstsche Formel einzusetzen hat. Um aus der wahren Konzentration eines Ions i seine aktive Masse $\imath$ zu erhalten, muß man i mit dem Aktivitätsfaktor F_a multiplizieren, welcher in der Regel < 1 ist. Die Größe von F_a wird bestimmt durch die Natur des Lösungsmittels, des betreffenden Ions, durch seine Konzentration, seine Wertigkeit, sowie durch Konzentration und Wertigkeit der anderen in der Lösung befindlichen Ionen.

Aus dieser Theorie würde zunächst folgen, daß auf die Indicatorsäuren nicht nur die sämtlichen noch in der Lösung befindlichen Kationen von Einfluß sind, sondern auch die Anionen. Auch nach dieser Auffassung ergibt sich eine Verschiedenheit der Wirkung der Ionen je nach ihrer Wertigkeit. Zweiwertige Ionen sind viel stärker wirksam als einwertige. Es folgt aus der Theorie ferner folgendes. Halten wir ein beliebiges Neutralsalz auf konstanter Konzentration, gleichviel ob es nur aus ein-, nur aus zweiwertigen oder aus verschiedenwertigen Ionen besteht, während wir h durch schwache Puffergemische variieren, so kann der Einfluß des Salzes auf den Dissoziationszustand des Indicators nicht von p_H abhängig sein[1]).

---

[1]) Diese Beziehung ergibt sich wie folgt. Das Gleichgewicht der Dissoziation des Indicators wird nach folgendem Massenwirkungsgesetz geregelt:

$$\frac{\alpha' h^{\cdot}}{\alpha} = k\,, \qquad (1)$$

wo α die Konzentration der undissoziierten Indicatormoleküle, α' und $h^{\cdot}$ die aktive Masse der Indicatoranionen resp. Wasserstoffionen bedeutet. Nun ist nach dem Früheren

$$\alpha' = F_a \cdot \alpha'\,. \qquad (2)$$

Aus (1) und (2) ergibt sich

$$h^{\cdot} = \frac{k}{F_a} \cdot \frac{\alpha}{\alpha'}\,, \qquad (3)$$

$$p_h = p_k + \varphi + \log F_a$$

Beide Auffassungen stimmen also darin überein, daß Neutralsalze mit einwertigen Kationen einen vom p_H unabhängigen Salzfehler geben müssen. Sie weichen aber voneinander ab, sobald mehrwertige Ionen im Spiel sind. Aus der ersten Theorie würde folgen, daß ein zweiwertiges Kation einen von h abhängigen Salzfehler erzeugt, während ein zweiwertiges Anion, wie Anionen überhaupt gar keinen Salzfehler macht. Aus der Bjerrumschen Theorie dagegen würde folgen, daß jedes Salz von beliebiger Wertigkeit seiner Ionen einen vom p_H unabhängigen Salzfehler gibt, ferner daß der durch zweiwertige Ionen erzeugte Fehler unter allen Umständen größer ist, als der durch einwertige und vor allem, daß die Wirkung eines zweiwertigen Anions ebenso groß oder wenigstens beinahe ebenso groß, wie die eines zweiwertigen Kations ist.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, müssen wir die Versuchsergebnisse betrachten. Erstens: läßt sich durch gewisse Beobachtungen, wie Änderung der Farbe, Anhaltspunkt dafür gewinnen, daß sich ein Salz des Indicators bildet? In einigen Fällen läßt sich diese Frage sehr leicht entscheiden. Benutzen wir als fremdes Ion ein Salz wie salzsaures Optochin oder Eucupinotoxin (s. Tabelle III), so verändert sich entweder die Nuance ein wenig (Optochin) oder bei geeigneter h läßt sich sogar ein Farbgrad > 1 herstellen (Eucupinotoxin). Diese beiden Tatsachen sind nur erklärbar durch die Annahme, daß sich eine andere Molekülgattung mit anderen chromogenen Eigenschaften gebildet hat, und diese ist offenbar das Salz der Indicatorsäure mit der Alkaloidbase. Es würde auch gar zu sehr allen unseren Vorstellungen widersprechen, wollten wir die Möglichkeit einer solchen Salzbildung ableugnen.

Ein zweiter Fall, bei dem sicher eine Salzbildung eintritt, ist folgender. Wenn wir als Zusatz-Elektrolyt einen Eiweißkörper benutzen, so erhalten wir einen deutlich erkennbaren Indicatorfehler bei einer stark sauren Reaktion, bei welcher der

---

während ohne Salz die Gleichung

$$p_h = p_k + \varphi ,$$

besteht. Damit ist der Satz von der Unabhängigkeit des Salzfehlers von p_H bewiesen, denn F_s ändert sich mit der h nicht, wenigstens unter den angenommenen Versuchsbedingungen.

$$\varphi \text{ bedeutet überall } - \log \frac{\alpha}{\alpha'}$$

Eiweißkörper als Kation zugegen ist. Dagegen gibt Eiweiß in alkalischer Lösung keinen Indicatorfehler.

Die Versuche mit Blutserum stellt folgende Tabelle dar:

Tabelle VIII.

Zusatz zur Herstellung der h	p_H (elektrometr. gemess.)	p_H (colorimetr. gemess.)	Derselbe nach Abzug des Salzfehlers	Eiweißfehler
HCl	2,82	3,35	3,25	+0,43
HCl	3,16	3,70	3,60	+0,44
Phosphatpuffer . .	7,56	7,54	7,54	−0,02
„ . .	7,62	7,67	7,67	+0,05

Der Eiweißfehler ist also in der Tat nur im sauren Gebiet vorhanden, im alkalischen fällt er in die Fehlergrenzen der Methode. Man muß allerdings berücksichtigen, daß die Messungen im sauren und alkalischen Gebiet mit verschiedenen Indicatoren (α-Dinitrophenol resp. m-Nitrophenol) gemacht worden sind.

Ähnliches ergeben Versuche mit Casein, dessen isoelektrischer Punkt $p_H = 4,6$ entspricht[1]). Es wurde eine 1 proz. Caseinlösung untersucht. Die Beurteilung der Farbtiefe wurde in Anbetracht der minimalen Trübung nach Sörensen durch Imitierung derselben in der Vergleichslauge durch Versetzen mit $BaSO_4$ (Gemisch von Na_2SO_4 + $BaCl_2$-Lösung) erleichtert. Die Versuche ergaben folgendes. Die benutzte Stammlösung des Caseins war eine solche in 0,1 n-Na-Acetat:

Tabelle IX.

In der Lösung befindl. Elektrolyte	Angewendeter Indicator	p_H colorimetr.	p_H elektrometr.	Differenz der p_H-Werte
Acetatgemisch .	p-Nitrophenol	5,63	5,57	+0,06
Phosphatgemisch	m-Nitrophenol	6,97	6,91	+0,06
Essigsäure . . .	α-Dinitrophen.	3,25	2,89	+0,36

Ein Versuch, das gleiche mit Gelatine zu beweisen, glückte im allgemeinen deshalb nicht, weil die durch sie hervorgebrachten Fehler klein sind (s. Versuchsbeispiele im Anhang). Der einzige der Indicatoren, der einen deutlichen Fehler mit ihr gibt, ist β-Dinitrophenol. Hier lag der Fehler in der erwarteten Richtung: Lösungen von 2 proz. Gelatine mit etwas HCl ergeben p_H =

Tabelle X.

	1.	2.
Colorimetrisch	1,93	2,00
Elektrometrisch	1,27	1,53
Differenz	+0,66	+0,47

[1]) Michaelis u. Pechstein, Diese Zeitschr. 47, 260. 1912.

Bei allen anderen Indicatoren ist der Gelatinefehler zu vernachlässigen.

Nehmen wir aber als Salz ein einfaches anorganisches Neutralsalz, so wird weder jemals die Nuance verändert, noch wird jemals der Farbgrad 1 überschritten. Die einzige Wirkung eines echten Neutralsalzes ist die, daß es bei mittleren Farbgraden die Farbtiefe verstärkt, oder was dasselbe ist, den Farbgrad erhöht. Diese Erscheinung kann entweder in dem Sinne gedeutet werden, daß sich zwar ein Salz der Indicatorsäure bildet, daß aber dieses Salz in bezug auf seine Lichtabsorption genau die gleichen Eigenschaften hat wie das freie Ion, oder sie kann in dem Sinne gedeutet werden, daß sich kein Salz bildet, sondern daß die Salzwirkung auf die Farbe ein „Bjerrumeffekt" ist. Die Farbstoffanionen werden in ihrer Aktivität vermindert, und, um das Gleichgewicht aufrechtzuhalten, muß die Säure nachdissoziieren, wodurch die wahre Konzentration der Farbstoffionen und somit die Farbtiefe größer wird.

Zur Entscheidung dieser beiden Möglichkeiten können uns die Beobachtungen über verschiedenwertige Ionen dienen:

1. Salze mit zweiwertigem Kation ergeben einen viel größeren Salzfehler als solche mit einwertigem. 2. Zweiwertige Anionen sind ebenfalls wirksamer als einwertige Anionen. 3. Der durch zweiwertige Kationen hervorgerufene Salzfehler ist nur wenig größer, als der durch zweiwertige Anionen hervorgerufene. 4. Der durch zweiwertige Kationen verursachte Fehler ist, soweit es die Fehlerquellen zu beurteilen gestatten (s. Kurven Abb. 2—5) nicht ganz unabhängig vom p_H, vielmehr wird die Dissoziationskurve der Indicatoren bei Gegenwart von $CaCl_2$ ein wenig versteilert. Diese Versteilerung ist gering und wir wollen in ihrer Beurteilung vorsichtig sein. Sie sind zwar bei den verschiedenartigen Indicatoren, die wir untersuchten, überall im gleichen Sinne, jedoch reichen die Ausschläge nicht immer viel über die Fehlergrenzen.

Was die Beobachtungen 1—3 betrifft, so liegt ihnen außer den obigen folgende Versuchsreihe mit α-Dinitrophenol zugrunde (Tab. XI). Die Größe des Salzfehlers wird durch die Differenz des jeweiligen p_k und des ohne Salzzusatz erhaltenen Wertes von p_k erkannt.

Zusammenfassend können wir also sagen: Bei gewöhnlichen anorganischen Salzen beruht der Salzfehler wohl über-

Tabelle XI.

Konzentration des Indicators	Puffer	Konz. d. Kationen in demselb.	Zugesetztes Salz	Konz. des Kation	p_k	F	p_k
1/10 d. gesätt. Lösung	Essigsäure	—	KCl	0,5 m	2,55	0,046	3,87
1/10 "	"	—	KCl	0,5 m	2,93	0,104	3,87
1/10 "	Acetat	0,001	KCl	0,5 m	3,15	0,160	3,87
1/10 "	"	0,001	K_2SO_4	0,5 m	3,32	0,26	3,77
1/10 "	"	0,002	K_2SO_4	0,5 m	3,41	0,33	3,73
1/10 "	"	0,005	K_2SO_4	0,5 m	3,69	0,47	3,74
1/10 "	Essigsäure	—	$CaCl_2$	0,5 m	2,45	0,06	3,65
1/10 "	"	—	$CaCl_2$	0,5 m	2,57	0,08	3,62
1/10 "	"	—	$CaCl_2$	0,5 m	2,95	0,18	3,60
1/10 "	"	—	$AlCl_3$	0,5 m	2,20	0,036	3,63
1/10 "	"	—	$AlCl_3$	0,5 m	2,34	0,05	3,62
1/10 "	"	—	$AlCl_3$	0,5 m	2,62	0,09	3,63
Aus früheren Versuchen ohne Salz ergibt sich:							4,07

wiegend, wenn auch nicht allein auf einem „Bjerrumeffekt" oder, wie man sich wohl mit Arrhenius ausdrücken darf, darauf, daß die Dissoziationskonstante der Indicatorsäure durch Salze vergrößert wird. Enthält das Salz aber Kationen von jener besonderen, bisher nicht gut faßbaren Eigenschaft, die wir vorläufig als „gute Bindungsfähigkeit", „starke Adsorbierbarkeit", „geringe Entladungsspannung" oder dgl. bezeichnen können (Eiweiß, Chinin), so tritt der Bjerrumeffekt hinter einer echten Salzbildung zurück. Ein solcher kann nämlich nur bei verhältnismäßig hoher Ionenkonzentration gut meßbar zum Ausdruck kommen. Daher kommt es auch, daß bei unseren Indicatoren der Salzfehler in physiologischer Salzlösung noch kaum merklich ist. Dagegen kann ein Salzfehler infolge starker Salzbildung des Kations mit dem Indicator schon in so niederer Konzentration stark meßbar werden, daß von einem Bjerrumeffekt noch keine Rede sein kann.

IV. Die Temperaturkoeffizienten der Indicatorkonstanten.

Das Bedürfnis, p_H einer Lösung nicht nur bei Zimmer-, sondern auch bei beliebigen Temperaturen zu bestimmen, ist oft vorhanden. Bisher hat man sich in der Regel damit geholfen, daß man p_H elektrometrisch bei Zimmertemperatur bestimmte und die Korrektion für diejenige Temperatur bei der man den p_H zu wissen wünschte, entweder ganz vernachlässigte oder, wie Michaelis und Rothstein[1]) es jüngst getan haben, rechnerisch vor-

[1]) Michaelis u. Rothstein, Diese Zeitschr. 105, 60. 1920.

nahm. Die Bedingungen für eine genaue rechnerische Korrektur sind aber selten gegeben. Eine elektromotorische Messung von p_H, bei verschiedenen Temperaturen ist zwar durchaus möglich und von Hasselbalch und Michaelis auch schon für bestimmte Zwecke ausgeführt worden, ist aber sehr umständlich, da man die Messung nur in einem Luftthermostaten vornehmen kann, der eine wesentliche Komplikation der Apparatur ist und doch nur eine langsame Einstellung der Temperatur verbürgt. Wäre eine einfache Methode zur Berücksichtigung der Temperatur vorhanden gewesen, so wäre diese sicherlich häufig angewendet worden. So hat auch schon T. Gaarder[1]) bei Untersuchung des Meerwassers es als eine Beschränkung der Sörensenschen Indicatormethode empfunden, daß sie nur für 18° eingestellt ist. Unsere jetzige Methode gestattet nun leichter als eine andere, die Temperatur zu berücksichtigen. Es ist hierzu nur erforderlich, die Indicatorkonstanten für verschiedene Temperaturen zu kennen. Für zwei der angewendeten Indicatoren (m- und p-Nitrophenol) liegen gute Bestimmungen der Temperaturkoeffizienten in der Literatur vor von Holleman[2]) und Lundén[3]), welche aus Leitfähigkeits- und Hydrolysedaten berechnet sind. Wir erwähnten schon, daß die von diesen Autoren gewonnenen Dissoziationskonstanten für 18° ziemlich befriedigend mit den mit unserer Methode gewonnenen Werten übereinstimmen. Aber auch diese Temperaturkoeffizienten können wir mit unserer Methode bestimmen.

Die Bestimmung wurde für p-Nitrophenol folgendermaßen ausgeführt: In einer Reihe von 6—8 Reagensgläsern wurden steigende Mengen der Indicatorsäure (0,2—0,5 ccm einer passenden Verdünnung der Stammlösung) eingefüllt und mit $^n/_{100}$-NaOH auf 10,5 ccm ergänzt. In ein weiteres Röhrchen wurde ein Gemisch von Essigsäure und Natriumacetat im Verhältnis von 1:20 eingefüllt mit einem Gehalt an Natrium von etwa $^n/_{300}$ und dazu eine passend gewählte Menge des Indicators (0,5 ccm der Stammlösung). Alle Röhrchen kamen dann in ein Wasserbad, dessen Temperatur während des Versuches allmählich verändert wurde. Die Kontrollröhrchen mußten auch ins Wasserbad gestellt werden, da ihre Farbtiefe bei Erwärmen stärker wird (übrigens in reversibler Weise). Es wurde nun bei verschiedenen Temperaturen beobachtet, welches der Vergleichsröhrchen mit dem Acetatgemisch in der Farbe übereinstimmte und dieser Wert noch durch Interpolation verfeinert. Die Ab-

[1]) T. Gaarder, Bergens Museums Aarbok 1916—17. Naturvidenskabelig Raekke Nr. 3.

[2]) Holleman, Rec. d. trav. chim. des Pays-Bas 21, 444. 1902.

[3]) Lundén, Journ. d. chim. phys. 5, 574. 1907; Zeitschr. f. physikal. Chemie 70, 253. 1910.

lesungen wurden bei mehreren Temperaturen während des Steigens und, um die Reversibilität des Vorganges zu kontrollieren, auch während des Fallens der Temperatur ausgeführt. Es durfte angenommen werden, daß p_H des Acetatgemisches sich während der Versuche nicht ändert, denn die Dissoziationskonstante der Essigsäure ändert sich nach den Messungen von Lundén innerhalb dieses Temperaturintervalles weniger als die Fehlergrenzen unserer Methode betragen, und der Dissoziationsgrad des Natriumacetats ändert sich sicherlich ebensowenig. Es durften daher Änderungen in der Farbstärke ausschließlich auf die Dissoziationskonstante des Indicators bezogen werden, wie sie sich aus der colorimetrischen Bestimmung des Dissoziationsgrades ergibt und schon oben besprochen wurde. Nach der Beziehung

$$k = h \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

ergibt sich

$$p_k = p_h + \log \frac{1 - \alpha}{\alpha},$$

$$\frac{d p_k}{dT} = \frac{d \log \frac{1 - \alpha}{\alpha}}{dT}.$$

Es ergeben sich für verschiedene Temperaturen folgende Werte von α resp. $\log \frac{1 - \alpha}{\alpha}$

Tabelle XII.

Temperatur	α	$\log \frac{1 - \alpha}{\alpha}$
16°	0,033	1,47
21°	0,042	1,36
30°	0,050	1,28
33,5° *	0,056	1,24
36°	0,060	1,20
38,2° *	0,062	1,18
42°	0,068	1,14
50° *	0,078	1,075

Die mit * bezeichneten Werte ergaben sich während des Steigens der Temperatur, die übrigen während des Fallens.

Als Mittelwert der gut übereinstimmenden Beobachtungen ergibt sich $\frac{d p_k}{dT} = -0,01165$. Hieraus folgen die in der Tabelle XVII,

S. 200 angeführten Werte der Konstanten, wobei wir für 18° den früher von uns bestimmten Wert 7,18 zugrunde legten. Unser Temperaturkoeffizient stimmt mit dem von Lundén völlig überein, aus dessen Zahlen sich zwischen 0 und 50° $\frac{dp_k}{dT} = -0{,}01160$ ergeben würde.

Genau dieselbe Methode konnten wir für α-Dinitrophenol anwenden. Es ergaben sich folgende Zahlen:

Tabelle XIII.

Temperatur	α	$\log \frac{1-\alpha}{\alpha}$
15°	0,18	0,65
16,5° *	0,18	0,65
24° *	0,20	0,59
26°	0,20	0,59
31° *	0,21	0,56
32°	0,225	0,535
40° *	0,225	0,535
40,5°	0,235	0,51
50° *	0,235	0,46
50°	0,26	0,45

Durch graphische Mittelung ergibt sich $\frac{dp_k}{dT} = -0{,}00571$.

Bei m-Nitrophenol mußten wir einen Phosphatpuffer anwenden. Bei diesem können wir nicht wie beim Acetat p_H als völlig unabhängig von der Temperatur betrachten. In einem genügend verdünnten Phosphatpuffer können wir die Änderung der h proportional setzen der Änderung der zweiten Dissoziationskonstante der Phosphorsäure. Diese beträgt sowohl nach der thermodynamischen Berechnung aus der Ionisationswärme, als auch experimentell nach Michaelis und Garmendia[1]) $\frac{dp_k}{dT} = -0{,}0038$. Nun ist

$$\frac{dp_k}{dT} = \frac{dp_H}{dT} + \frac{d\log\frac{1-\alpha}{\alpha}}{dT} = -0{,}0038 + \frac{d\log\frac{1-\alpha}{\alpha}}{dT}.$$

Das zweite Glied der rechten Seite ergab sich aus den colorimetrischen Messungen in derselben Weise wie bei den früheren Indicatoren.

[1]) Michaelis und Garmendia, Diese Zeitschr. 67, 436. 1914.

Tabelle XIV.

Temperatur	α	$\log \frac{1-\alpha}{\alpha}$
16° *	0,082	1,05
17°	0,085	1,03
26° *	0,092	0,99
29°	0,10	0,95
34,5°	0,117	0,88
35° *	0,10	0,95
41,5°	0,12	0,86
42° *	0,12	0,86
50° *	0,14	0,78

Als Mittelwert haben wir hier

$$\frac{d \log \frac{1-\alpha}{\alpha}}{dT} = -0{,}0076, \quad \text{daher} \quad \frac{dp_k}{dT} = -0{,}0114$$

(nach Lundén: 0,0115).

Für Phenolphthalein wurde die Methode ähnlich angewandt. Hier sind besondere Vorsichtsmaßregeln notwendig. Erstens muß darauf hingewiesen werden, daß für Phenolphthalein die Vergleichslösung der NaOH nicht wesentlich stärker als 0,01 n betragen darf, weil sonst allmählich besonders beim Erwärmen irreversible Abblassungen vorkommen können. Dagegen zeigt eine dünne Phenolphthaleinlösung in $^{n}/_{100}$-NaOH innerhalb der für eine Versuchsreihe notwendigen Zeit eine Abblassung weder in der Kälte, noch bei Erwärmen auf 50° und darüber. Ja sogar im Gegensatz zu den Nitrophenolen zeigt das Phenolphthalein überhaupt keine Farbänderung, wenn man es in $^{n}/_{100}$-Lauge erwärmt. Es war nur notwendig, die Versuche nicht über eine allzu lange Zeit auszudehnen. Wir gewannen den Eindruck, daß bei längerer Versuchsdauer die einzelnen Zahlen nicht eindeutige und umkehrbare Funktionen der Temperatur waren. Nun läßt sich aber eine ganze Versuchsreihe in weniger als einer Stunde reichlich beendigen und wenn dies geschah, waren die erhaltenen Werte bis auf die Fehlergrenzen der Methode eindeutig von der Temperatur abhängig. Die Phenolphthaleinlösung wurde in einem CO_2-freien Gemisch von Borsäure und NaOH geprüft, dessen Gesamtgehalt an Na etwa 0,02 n war und dessen Borsäuregehalt derartig gewählt wurde, daß ein Farbgrad von etwa 0,02 resultierte. Das p_H eines solchen Boratgemisches variiert mit der Temperatur aus demselben Grunde wie das eines

Phosphatgemisches, und zwar dürfen wir die Änderung der h der Änderung der Konstante der Borsäure proportional setzen. Aus den Daten von Lundén ergibt sich $\frac{d\,p_{k\,(\text{Borsäure})}}{dT} = -0{,}0076$. Experimentell erhielten wir folgende Werte:

Tabelle XV.

Temperatur	α	$\log \frac{1-\alpha}{\alpha}$
13,5°*	0,020	1,68
14,5°	0,020	1,68
16°	0,021	1,64
29°*	0,0235	1,61
30°	0,022	1,65
38,2°*	0,025	1,59
40,5°*	0,025	1,59

Es ergibt sich

$$\frac{d \log \frac{1-\alpha}{\alpha}}{dT} = -0{,}00337, \quad \text{daher} \quad \frac{d\,p_k}{dT} = -0{,}01097\,.$$

Für Salicylgelb wandten wir einen Boratpuffer an. Derselbe gab folgende Werte:

Tabelle XVI.

Temperatur	F	$\log \frac{1-F}{F-0{,}07}$
20°	0,24	0,65
45°	0,29	0,51

Ganz ähnlich wie vorher ist nun

$$\frac{d\,p_k}{dT} = -0{,}0076 + \frac{d \log \frac{1-F}{F-0{,}07}}{dT}$$

und es findet sich

$$\frac{d\,p_k}{dt} = -0{,}013\,.$$

Die so gewonnenen Temperaturkoeffizienten und die Zugrundelegung der früher erhaltenen Dissoziationskonstanten für 18° ergeben nun folgende Tabelle XVII.

Tabelle XVII.

p_k der Indicatoren für verschiedene Temperaturen.

Temperatur	Dinitrophenol 1:2:6	Dinitrophenol 1:2:4	p-Nitrophenol	m-Nitrophenol
0°	3,79	4,16	7,39	8,55
5°	3,76	4,13	7,33	8,49
10°	3,74	4,11	7,27	8,43
15°	3,71	4,08	7,22	8,38
18°	**3,69**	**4,06**	**7,18**	**8,35**
20°	3,68	4,05	7,16	8,32
25°	3,65	4,02	7,10	8,26
30°	2,62	3,99	7,04	8,21
35°	3,59	3,96	6,98	8,15
40°	3,56	3,93	6,93	8,09
45°	3,54	3,91	6,87	8,04
50°	3,51	3,88	6,81	7,99

Für Dinitrophenol 1:2:6 wurde derselbe Temperatur-Koeffizient benutzt wie für 1:2:4.

Die einzelnen Werte von p_k für Phenolphthalein und für Salicylgelb sind in die Tabelle nicht aufgenommen, weil wir sie praktisch nicht brauchen; für diese Indikatoren wenden wir die empirischen Tabellen S. 206 an. Bei diesen Tabellen sind auch die Temperaturkorrekturen angegeben.

Zum Vergleich hierzu seien die Konstanten aus der Literatur mitgeteilt, welche teils aus Leitfähigkeits-, teils aus Hydrolysedaten gewonnen wurden:

β-Dinitrophenol	25°	p_k = 3,76	(Bader, Zeitschr. f. physikal. Chemie 6, 289. 1890).
α-Dinitrophenol	25°	p_k = 4,10	
p-Nitrophenol	18°	p_k = 7,25	(Euler u. Bolin, Zeitschr. f. physikal. Chemie 66, 71. 1909.)
„	10°	7,35	(Lundén l. c.)
„	15°	7,29	
„	25°	7,15	
„	40°	6,90	
„	25°	7,19	(Holleman l. c.)
m-Nitrophenol	10°	8,48	(Lundén, l.c.)
„	15°	8,41	
„	25°	8,28	
„	40°	8,11	
„	50°	8,02	
Phenolphtalein	18°	9,77	(Hildebrand, l. c.)

Besonderheiten der Pikrinsäure.

Aus theoretischen Gründen ist es interessant, die Besonderheiten der Pikrinsäure als Indikator zu besprechen. Diese wird durch konzentrierte HCl entfärbt und verhält sich als Indikator prinzipiell wie die anderen Nitrophenole. Aber das Übergangsgebiet liegt bei einer so hohen *h*, daß die

Tabelle XVIII. Pikrinsäure.

Konzentration des Indicators	Flüssigkeit z. Herstell. der h	Zugesetztes Salz	Konzentr.	p_H aus Leitfähigk.	p_H (im Sinne totaler Dissoz.)	Färbegrad	p_k (be-rech-net)	
0,25°/oo	HCl	—	—	− 0,30	− 0,70	0,01	1,69	
0,25°/oo	"	—	—	− 0,15	− 0,34	0,12	0,71	
0,25°/oo	"	—	—	0,10	0	0,4	0,28	
0,25°/oo	"	—	—	0,10	0	0,42	0,24	Mittel 0,26
0,25°/oo	"	—	—	0,39	0,30	0,6	0,21	
0,25°/oo	"	—	—	0,39	0,30	0,59	0,23	
0,25°/oo	"	—	—	0,39	0,30	0,61	0,19	
0,25°/oo	"	—	—	0,91	0,84	0,79	0,35	
0,25°/oo	"	—	—	1,07	1,00	0,84	0,35	
0,25°/oo	"	—	—	(1,34	1,30	0,95	0,06)	
0,25°/oo	"	KCl	n	0,39	0,30	0,70		
0,25°/oo	"	"	0,5 n	0,39	0,30	0,75		
0,25°/oo	"	"	0,5 n	0,39	0,30	0,75		
0,25°/oo	"	$CaCl_2$	0,6 m	0,39	0,30	0,63		

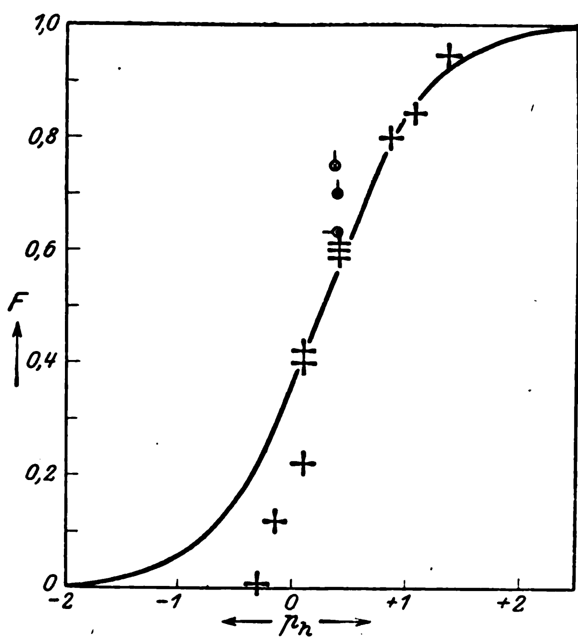


Abb. 8. Pikrinsäure. Abszisse = p_H (auf Grund der Dissoziationsgrade, wie sie sich aus den Leitfähigkeitsdaten von Kohlrausch ergeben).
+ ohne Salz. —O $CaCl_2$ 0,6 m.
KCl 0,5 m.

theoretische Durcharbeitung des Indikators auf dieselben Schwierigkeiten stößt, die die hochkonzentrierten Lösungen starker Elektrolyte im allgemeinen machen. Das beifolgende Diagramm gibt darüber Auskunft. Die h wurde überall durch HCl verschiedener Konzentration hergestellt und es wurde natürlich dasjenige p_H berücksichtigt, welches im endgültigen Volum nach Zusatz des Indikators angenommen werden mußte. p_H wurde nicht elektrometrisch gemessen, sondern aus der HCl-Konzentration berechnet. Und zwar wurden der Berechnung die üblichen Annahmen des Dissoziationsgrades auf Grund der Leitfähigkeitsdaten zugrunde gelegt, wobei wir uns bewußt blieben, daß wir in Anbetracht der Bjerrumschen Theorie wahrscheinlich eine als veraltet zu geltende Annahme machten. Solange die HCl-Konzentration nicht zu hoch ist, sind die beobachteten Punkte mit einer Dissoziationskurve gut vereinbar und es würde sich für die Pikrinsäure ergeben $p_k = 0{,}26$ und $k = 0{,}55$. Dies steht nicht im Einklang mit der nach anderen Methoden gewonnenen Konstante der Pikrinsäure. Die Leitfähigkeitsbestimmungen geben überhaupt keine Konstante und die Verteilungsmethode, ausgeführt von Rothmund und Drucker[1]), ergab $p_k = 0{,}8$. Das hängt wohl damit zusammen, daß die Pikrinsäure eine schon starke und nicht mehr dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz folgende Säure ist. Immerhin sind die Werte bis zu einer 1 norm. Konzentration an $H^{\cdot}$ noch gut konstant. Bei noch höherer h weichen die Beobachtungspunkte immer mehr von der theoretischen Dissoziationskurve ab und sie werden auch nicht besser, wenn wir statt der aus Leitfähigkeitsdaten berechneten h die Bjerrumsche Aktivität der $H^{\cdot}$ zugrunde legen, denn die Aktivität der Wasserstoffionen ist auf alle Fälle kleiner als die aus Leitfähigkeitsdaten berechnete Konzentration. Die Abweichungen würden unter Zugrundelegung der Bjerrumschen Aktivität noch größer. Etwas besser werden die Werte, wenn wir die wahre Konzentration der $H^{\cdot}$ zugrunde legen, welche aus der Bjerrumschen Annahme berechnet werden kann, daß Salzsäure unter allen Umständen total dissoziiert ist. Es ist anzunehmen, daß die schwer überblickbare Änderung der Hydratation der Ionen in so hohen Konzentrationen diese Abweichung verursachen. Von $p_H = 0$ bis 1,3 kann aber Pikrinsäure unter Benutzung des Wertes $p_k = 0{,}26$ zur Messung von p_h benutzt werden. Sie stellt somit eine gelegentlich wohl nützliche Erweiterung unserer Indicatorreihe dar.

Die praktische Anwendung der Methode.

Notwendige Reagenzien.

a) β-Dinitrophenol (1:2:6), gesättigte wässerige Lösung. Die Lösung wird zunächst warm gesättigt und am nächsten Tag von den abgeschiedenen Krystallen abfiltriert.

b) α-Dinitrophenol (1:2:4). Ebenfalls gesättigte wässerige Lösung.

[1]) Rothmund und Drucker, Zeitschr. f. physikal. Chemie 46, 827. 1903.

c) p-Nitrophenol, 0,1 proz. wässerige Lösung.

d) m-Nitrophenol, 0,3 g auf 100 g Wasser unter leichtem Erwärmen aufgelöst.

e) Phenolphthalein, 0,04 g in 30 ccm Alkohol gelöst, auf 100 mit Wasser aufgefüllt.

f) Salicylgelb („Alizaringelb G G"). Eine gesättigte alkoholische Lösung solange (ungefähr zehnfach) mit 50 proz. Alkohol verdünnt, bis ein Pröbchen davon mit der zehnfachen Menge $^n/_{10}$-NaOH versetzt ungefähr die gleiche Farbtiefe wie ein 30fach verdünnter offizineller Liquor ferri sesquichlor. hat. (Man beachte, daß die Kontrollen bei diesem Farbstoff nicht mit 0,01-, sondern mindestens mit 0,1 norm. NaOH gemacht werden müssen.)

Die für den eigentlichen Versuch angewendeten Reagensgläschen müssen genau gleichen Durchmesser haben.

Eine abgemessene Menge der zu untersuchenden Lösung, z. B. 5 oder 10 ccm, werden aus einer Pipette mit so viel der geeigneten Indicatorlösung versetzt, daß eine ganz schwache Färbung entsteht. Die Menge Indicatorlösung kann wenn nötig, bis zu 1 ccm betragen, im allgemeinen ist es besser, nur bis 0,5 ccm oder $^1/_{10}$ Volumen zu gehen. Die verwendete Menge muß genau abgelesen werden. Von den Indicatoren muß man denjenigen wählen, welcher der Bedingung genügt, daß er in einer Menge von 0,2 bis höchstens 1 ccm eine zwar schon deutliche, aber nicht zu intensive Färbung erzeugt. Nunmehr füllt man in ein zweites Reagensglas 4 bzw. 9 ccm einer ungefähr $^n/_{100}$-NaOH. Es kommt nicht auf sehr genaue Innehaltung dieser Konzentration an. Nun gibt man von dem gleichen Indicator soviel zu, daß die Farbe zunächst angenähert gleich der im ersten Röhrchen wird. In der Regel wird man hierzu eine passende, z. B. zehnfache Verdünnung der Indicatorstammlösung anwenden müssen. Dann füllt man mit $^n/_{100}$ Lauge zu dem Gesamtvolumen des ersten Röhrchens auf. Nunmehr vergleicht man die Farbe beider Röhrchen genauer. Wir finden am geeignetsten hierzu die Betrachtung im durchfallenden Licht gegen einen weißen Hintergrund. Je nach den Umständen ist es vorteilhafter, die Breite oder die Länge des Reagensrohres zu durchblicken. Sind die Farben nicht völlig gleich, so probiert man in einem anderen Röhrchen mit NaOH mit etwas anderer Farbstoffmenge und wiederholt das solange, bis man die gleiche Farbtiefe, wie in der zu untersuchenden Flüssig-

keit gefunden hat oder man interpoliert zwischen zwei sehr ähnlichen Vergleichsröhrchen. Je nach der absoluten gesamten Farbstoffmenge ist die relative Unterscheidbarkeit verschieden scharf, bei geeigneter Farbstoffmenge kann man Unterschiede von 10% noch sehr gut wahrnehmen und meist noch zwischen zwei Röhrchen interpolieren, deren Farbgehalt sich um 10% unterscheidet. Praktisch empfiehlt sich eine Abstufung der Vergleichslösungen des Farbstoffs um etwa 15%; also z. B. 0,3; 0,35; 0,40; 0,46; 0,53 usw. Dann sind die Unterschiede zwischen zwei Nachbarröhrchen einerseits schon recht deutlich erkennbar, andererseits für eine brauchbare Interpolation durch Schätzung nicht zu groß. Das durch Beobachtung bzw. Interpolation festgestellte Verhältnis der Indicatormenge in der farbgleichen Lauge und der zu untersuchenden Lösung nennen wir den „Farbgrad", *F*. Hiermit ist das Experimentelle der Bestimmung beendet, nunmehr folgt die Berechnung. Sie erfolgt für die Indicatoren a bis d (S. 202 u. 203) einfach nach der Gleichung:

$$p_H = p_k + \varphi\,.$$

Für p_k muß unter Berücksichtigung der Versuchstemperatur der aus Tabelle XVII, S. 200 angegebene Wert eingesetzt werden.

φ ist eine Funktion des Farbgrades F $\left(\text{nämlich } \varphi = \log \frac{F}{1-F}\right)$. Wir haben φ als Funktion des Färbegrades F in dem Diagramm (Abb. 9) und in der Tabelle XIX angegeben. Für die Benutzung des Diagramms ist folgendes zu bemerken. Die Kurve I ist ohne weiteres

Tabelle XIX.

Die Funktion φ des Farbgrades F.

F	φ	F	φ	F	φ	F	φ
0,001	−3,00	0,01	−2,00	0,10	−0,95	0,50	±0
0,0012	−2,91	0,012	−1,90	0,12	−0,85	0,55	+0,10
0,0014	−2,85	0,015	−1,81	0,14	−0,79	0,60	+0,20
0,0016	−2,80	0,025	−1,60	0,16	−0,71	0,65	+0,28
0,0018	−2,75	0,03	−1,51	0,18	−0,65	0,70	+0,38
0,002	−2,69	0,04	−1,38	0,20	−0,59	0,75	+0,49
0,003	−2,52	0,05	−1,28	0,25	−0,47	0,80	+0,60
0,004	−2,40	0,06	−1,20	0,35	−0,25	(0,85	+0,75)
0,005	−2,30	0,07	−1,12	0,40	−0,18	(0,90	+0,97)
0,006	−2,22	0,08	−1,06	0,50	±0,0	(0,95	+1,25)
0,007	−2,15	0,09	−1,00				
0,008	−2,07	0,10	−0,95				
0,010	−2,00						

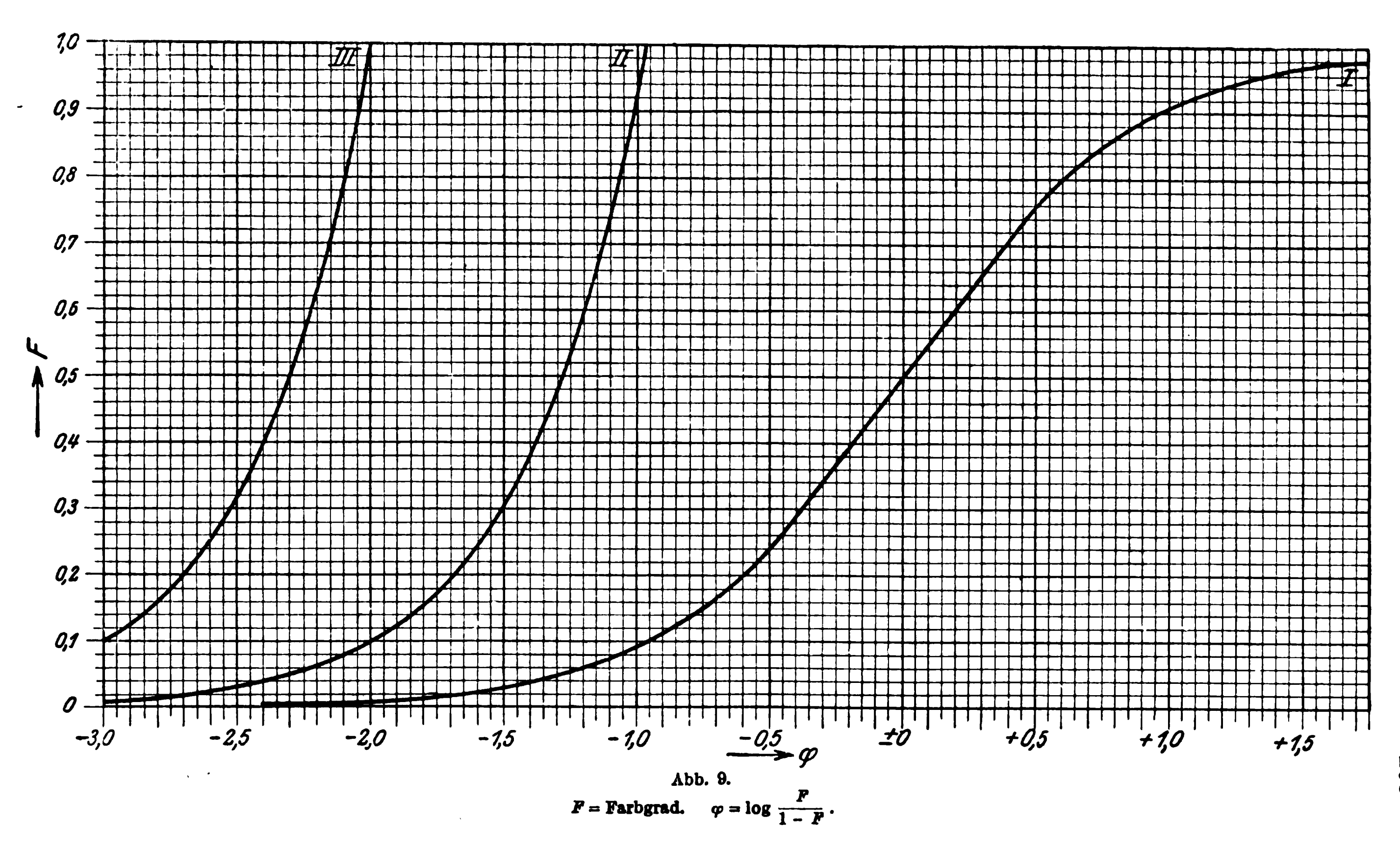


Abb. 9.

F = Farbgrad. $\varphi = \log \frac{F}{1 - F}$.

in dem angegebenen Sinne benutzbar. Da nun die Ablesung dieser Kurve am linken Ende, wo sie nach den früheren Auseinandersetzungen gerade am wertvollsten ist, etwas schwierig ist, ist dieser Teil in Kurve II in zehnfach vergrößertem Ordinatenmaßstab gezeichnet. Also z. B. der mit 0,1 bezeichnete Punkt der Ordinate ist mit Bezug auf Kurve II zu lesen 0,01. Für den Bedarfsfall ist Kurve III anzuwenden, die mit 100fach vergrößertem Ordinatenmaßstab gezeichnet wurde. Der Ordinatenpunkt 0,1 bedeutet also für sie 0,001. Die Zahlen der Abszisse behalten natürlich ihre Bedeutung für alle drei Kurven ungeändert.

Für Phenolphthalein geben wir aus den schon erwähnten Gründen folgende empirische Tabelle zusammengehöriger Farbgrade und p_H für 18° C:

Tabelle XX.

Tabelle für Phenolphtalein bei 18° C.

F	p_H	F	p_H	F	p_H
0,01	8,45	0,16	9,10	0,55	9,80
0,014	8,50	0,21	9,20	0,60	9,90
0,030	8,60	0,27	9,30	0,65	10,0
0,047	8,70	0,34	9,40	0,70	10,1
0,069	8,80	0,40	9,50	0,75	10,2
0,090	8,90	0,45	9,60	0,80	10,3
0,120	9,00	0,50	9,70	0,845	10,4
				0,873	10,5

Ist die Bestimmung mit Phenolphthalein bei anderer Temperatur als 18° ausgeführt, so wird der Wert zum Schluß dadurch korrigiert, daß man von dem erhaltenen p_H noch 0,0110 (T — 18) subtrahiert, wo T die Beobachtungstemperatur bedeutet.

Und in ähnlicher Weise gilt für Salicylgelb für 20° die Tabelle:

Tabelle XXI.

Tabelle für Salicylgelb bei 20° C.

F	p_H	F	p_H
0,13	10,00	0,56	11,20
0,16	10,20	0,66	11,40
0,22	10,40	0,75	11,60
0,29	10,60	0,83	11,80
0,36	10,80	0,88	12,00
0,46	11,00		

Für jeden Grad Temperatur oberhalb 20° ist 0,013 zu subtrahieren.

Der so erhaltene Wert bedarf unter Umständen noch einer Berücksichtigung des Salzfehlers, welcher bei physiologisch in Betracht kommenden Flüssigkeiten im allgemeinen sehr klein ist. Folgende Tabelle gibt diesen Salzfehler für physiologische Salzkonzentrationen und für 0,5 n-Konzentration an Kochsalz an:

Tabelle XXII.

Zu addierender Salzfehler.

	0,5 m Salzgehalt	0,15 n Salzgehalt (physiol. Salzlösung)
β-Dinitrophenol	0,30	0,12
α-Dinitrophenol	0,20	0,10
p-Nitrophenol	0,05	0
m-Nitrophenol	0,05	0
Phenolphtalein	0,20	0,08

Der Fehler durch Eiweiß und Pepton ist nicht so allgemein anzugeben. Einige Versuche am Schluß zeigen, wie klein diese Fehler sind.

Anwendung der Methode für gefärbte und getrübte Flüssigkeiten.

Nicht allzustark gefärbte Flüssigkeiten sind dieser Methode ebenfalls zugänglich. Es gibt zwei Möglichkeiten, um gefärbte Flüssigkeiten zu messen.

1. Da bei allen physiologisch in Betracht kommenden Lösungen p_H nicht geändert wird, wenn man die Lösung mit Wasser von ungefähr gleichem Gehalt an Neutralsalzen verdünnt, so kann man eine schwach gefärbte Flüssigkeit für die Untersuchung dadurch vorbereiten, daß man sie zunächst 5—10fach mit ausgekochter CO_2-freier NaCl-Lösung verdünnt, deren Salz-Konzentration ganz roh der der zu untersuchenden Lösung entspricht.

2. Aber auch ohne dieses Hilfsmittel kann man auskommen, wenn man als Vergleichslösung nicht einfach $^1/_{100}$ n-NaOH nimmt, sondern eine Probe der zu untersuchenden Flüssigkeit, nachdem sie mit NaOH alkalisch gemacht ist. Da nun diese Lösungen Pufferwirkung haben, genügt es nicht, sie auf ein Gehalt von $^1/_{100}$ n-NaOH zu bringen, sondern man muß so viel Lauge nehmen,

daß ein weiterer Zusatz von Lauge die Farbtiefe nicht mehr vergrößert. Im allgemeinen ist dies leicht zu erreichen, wenn man tropfenweis offizinelle NaOH zusetzt, nicht mehr als nötig ist, um Phenolphthalein maximal zu röten. In manchen Flüssigkeiten, z. B. im Harn, entsteht dadurch häufig eine Fällung. Von dieser muß die Flüssigkeit abfiltriert werden, am besten nach vorangegangenem Erwärmen. Ferner wird die Farbe des Harns durch den Zusatz der Lauge oft etwas dunkler, sie muß dann durch passende Verdünnung der der ursprünglichen Flüssigkeit erst möglichst genau gleichgemacht werden. Auf diese Weise erreichen wir, daß in beiden zu vergleichenden Lösungen außer dem Indicator sich noch ein zweiter Farbstoff befindet, der aber wegen seiner Gleichheit in beiden Röhrchen die Farbvergleichung nicht stört. Durch die fremde Farbe wird nicht nur die Farbtiefe, sondern auch die Nuance des Indicators geändert. Die Farbenvergleichung, welche sich bei farblosen Flüssigkeiten nur auf die Farbtiefe erstreckt, ist für gefärbte Flüssigkeiten mehr eine Vergleichung verschiedener Nuancen.

Bei der Sörensenschen Methode ist es nötig, bei Messung gefärbter Flüssigkeiten zu den Vergleichspufferlösungen geeignete färbende, aber von der p_H unabhängige Stoffe hinzuzufügen. Unserer Methode ist es als Vorteil anzurechnen, daß dieser hinzugefügte färbende Stoff der gleiche ist, wie in der zu untersuchenden Lösung. Ist die Eigenfarbe der Flüssigkeit unbequem stark, so kann man beide Methoden kombinieren: man verdünnt die Lösung ein wenig und bestimmt darin p_H nach der zweiten Methode.

Für leicht getrübte Lösungen läßt sich ein ähnliches Prinzip anwenden. Man verdünnt die Lösung zunächst nach Bedarf, bis die Trübung nur gering ist und benutzt als Vergleichslauge eine alkalisch gemachte Verdünnung der gleichen Lösung, deren Konzentration so gewählt ist, daß die Trübungen gleich sind.

Nicht immer gelingt es, die Trübungen gleichzumachen, weil sich viele Trübungen in Lauge aufhellen. In diesem Fall kann man die Sörensensche Vorschrift (Zufügung einer $BaSO_4$-Aufschwemmung, bereitet aus $Na_2SO_4 + BaCl_2$) anwenden.

Anwendungsbeispiele.

Beispiele für verdünnte, ungefärbte, genau definierte Pufferlösungen anzuführen ist überflüssig. Sie sind in den obigen Tabellen reichlich

gegeben. Abweichungen im p_h von der elektrometrischen Messung im Betrage von $\pm$ 0,1 kommen nur unter den ungünstigsten Verhältnissen vor. Im allgemeinen übersteigt die Abweichung $\pm$ 0,05 selten und im günstigsten Bereich eines jeden Indikators ist sie meist noch viel kleiner und erreicht somit dann die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit elektrometrischer Messungen. Über den Genauigkeitsgrad der Methode bei gefärbten und eiweißhaltigen Flüssigkeiten geben folgende Beispiel Auskunft.

1. Zu 5 ccm Harn kamen 2 (!) ccm p-Nitrophenol. Die Kontrolle wurde nach der zweiten Methode für gefärbte Flüssigkeiten hergestellt. $F = 0{,}02$, $p_h = 5{,}48$ (elektrometrisch = 5,64).

2. Zu 3 ccm Harn wurden 3 ccm p-Nitrophenol gefügt. Kontrolle wie bei 1. $F = 0{,}013$, $p_h = 5{,}28$ (elektrometrisch = 5,24). Im allgemeinen soll man nicht so viel von der Farblösung nehmen. Hier (im Fall 1 und 2) war das wegen des geringen Farbgrades und der Eigenfarbe der Flüssigkeit notwendig gewesen. Die Beispiele zeigen, daß sogar eine so starke Verdünnung mit der Farblösung fast belanglos ist.

3. 1 proz. Peptonlösung mit 0,01 n HCl. Zu 5 ccm 1 ccm α-Dinitrophenol. $F = 0{,}20$, $p_h = 3{,}37$ (elektrometrisch 3,38).

4. 1 proz. mit HCl angesäuerte Gelatinelösung, gemessen mit α-Dinitrophenol. Zu 5 ccm 0,5 ccm Farblösung. $F = 0{,}10$, $p_h = 3{,}12$ (elektrometrisch 3,06).

5. 1 proz. Casein (in $^n/_{20}$-Na-Acetat gelöst). Zu 5 ccm 0,2ccm p-Nitrophenol. $F = 0{,}05$, $p_h = 5{,}92$ (elektrometrisch: 5,90).

6. Zu 2,5 ccm einer mit Essigsäure angesäuerten Nährbouillon 1 ccm p-Nitrophenol. Als Kontrolle 2,4 ccm Bouillon + 0,1 ccm n-NaOH. $F = 0{,}015$, $p_h = 5{,}36$ (elektrometrisch: 5,45).

7. Zu 2,5 ccm Bouillon 1 ccm m-Nitrophenol. Kontrolle wie bei 6. $F = 0{,}04$, $p_h = 6{,}97$ (elektrometrisch: 7,05).

8. Zu 2,5 ccm derselben fünffach verdünnten (ganz blassen) Bouillon 1 ccm m-Nitrophenol. Kontrolle: 0,01 n-NaOH. $F = 0{,}044$, $p_h = 7{,}00$ (elektrometrisch in der unverdünnten Bouillon 7,05). Dieses Beispiel zeigt auch, daß in einer gutgepufferten Flüssigkeit, wie sie Nährbouillon ist, eine fünffache Verdünnung keine merkliche Änderung im p_h erzeugt und vor der Messung zum Zweck der Herabsetzung der Eigenfärbung erlaubt ist.

Zusammenfassung.

Versetzt man irgendeine zu untersuchende Lösung mit einem einfarbigen Indicator, so wird man in der Regel eine Farbtiefe erhalten, die zwischen der maximalen Farbtiefe bei stark alkalischer Reaktion und dem ganz farblosen Zustand bei extrem saurer Reaktion steht. Durch colorimetrische Vergleichung der erhaltenen Farbtiefe mit der bei extrem alkalischer Reaktion erreichbaren maximalen Farbtiefe bei gleicher Farbstoffmenge erfährt man den „Farbgrad“ F, d. h. den Dissoziationsgrad (α)

der Indicatorsäure in der zu untersuchenden Lösung. Aus diesem kann man h berechnen, nach der Formel

$$h = k \cdot \frac{1 - \alpha}{\alpha},$$

oder logarithmiert :

$$p_h = p_k + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha},$$

p_k bedeutet den negativen Logarithmus der Dissoziationskonstante des Indicators. Derselbe ist für unsere Indicatoren und für verschiedene Temperaturen aus der Tabelle XVII, S. 200 zu entnehmen. Das zweite Glied ist eine Funktion (φ) der colorimetrisch zu beobachtenden Größe α. Sie ist aus Tabelle XIX, S. 204, oder aus Abb. 9, S. 205 zu entnehmen. Die praktische Ausführung der Colorimetrie geschieht durch ein Verdünnungsverfahren (S. 203).

Geeignete Indicatoren sind auf S. 170 beschrieben. Ihre Salzfehler sind so gering, daß sie unter physiologischen Bedingungen meist zu vernachlässigen sind. Es wird eine Theorie des Salzfehlers entwickelt (S. 187). Für zwei der Indicatoren (Phenolphthalein und m-Nitrobenzolazosalicylsäure) sind aus besonderen Gründen nicht die obigen Formeln, sondern spezielle Tabellen (S. 206) anzuwenden. Die Methode läßt sich (S. 207) auch für schwachgefärbte oder getrübte Lösungen anwenden.

Besondere Vorteile der Methode sind, daß sie für beliebige Temperaturen anwendbar ist und der Vergleichspufferlösungen nicht bedarf.

Untersuchungen über den „säurelöslichen Phosphor" in Blut und Plasma bei verschiedenen Tieren sowie einige Studien über die Toxikologie der verschiedenen Phosphate.

Von

Poul Iversen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 17. Juni 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich verschiedene Methoden zur Bestimmung von Phosphor in kleinen Blut- und Plasmamengen (Greenwald, Feigl, Bloor, Iversen u. a. m.) besprochen. Zu den experimentellen Untersuchungen, die an diese Arbeit anknüpfen, benutzte ich die von mir ausgearbeitete Methode.

Bereits 1898 führte Abderhalden[2]) bei Analysen von Blut und Serum die Bezeichnung Gesamtphosphor ein, die Lipoid- und Proteinphosphor sowie einen Rest umfaßt, den er als anorganischen Phosphor auffaßte, und der als Differenz zwischen Gesamtphosphor und Lipoid- und Proteinphosphor bestimmt wurde. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen, worauf ich später zurückkommen werde, galten als Standardzahlen, bis die Frage 1913 von Greenwald[3]) aufgenommen wurde.

Dieser Forscher behielt die Bezeichnungen Gesamt-, Lipoid- und Proteinphosphor bei, führte aber außerdem die Bezeichnung „säurelöslicher Phosphor" ein, worunter der Phosphor in den phosphorhaltigen Bestandteilen verstanden wird, die in Lösung treten, wenn Blut oder Plasma mit einer salzsauren (oder essigsauren) Pikrinsäurelösung gefällt und extrahiert wird. Wie Greenwald gezeigt hat, ist der „säurelösliche Phosphor" unlöslich in Äther und Alkohol, weshalb Abderhaldens anorganischer Phosphor also Greenwalds „säurelöslichem Phosphor" entspricht, welche Bezeichnung, wenn sie auch nicht besonders treffend

---

[1]) Poul Iversen, Diese Zeitschr. **104**, 22. 1920.

[2]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie **25**, 65. 1898.

[3]) J. Greenwald, Journ. of Biol. Chem. **14**, 369. 1913.

ist, doch der von Abderhalden angewandten vorzuziehen ist, indem der Phosphor nicht ausschließlich als Phosphate in der betreffenden Fraktion vorhanden ist. Greenwalds Bezeichnung ist von Bloor, Feigl u. a. aufgenommen worden, und wird aus praktischen Gründen auch in gegenwärtiger Abhandlung benutzt werden. Die Frage nach der Natur der dem „säurelöslichen Phosphor" entsprechenden Stoffe hat namentlich Greenwald[1]), Feigl[2]), und Bloor[3]) beschäftigt. Es fragt sich in erster Reihe: Kommt der Phosphor in anorganischen oder organischen, in ionisierten oder nichtionisierten Verbindungen vor?

Greenwald meint, daß es sich in betreff des Serums fast ausschließlich um anorganische Verbindungen handelt, indem er findet, daß die betreffenden Stoffe, die also im Filtrat aus der Pikrinsäurefällung vorkommen, in Alkohol, Äther, Chloroform und Aceton unlöslich sind und zum allergrößten Teil imstande sind zu dialysieren. Nach der Dialyse findet er nur 0,3 mg Phosphor pro 100 ccm Serum, was etwa 10% der ganzen ursprünglichen „säurelöslichen" Menge entspricht. Eine ganz entsprechende Menge bleibt in ungelöstem Zustande zurück, wenn im Filtrat aus der Pikrinsäurefällung mit Ammoniummolybdat oder Magnesiamixtur bei Zimmertemperatur gefällt wird.

Feigl, der Greenwalds Methode zur Phosphorbestimmung (Nephelometrie) benutzte, führt für den Phosphor, der nicht von ionisierten Phosphaten herrührt, die Bezeichnung Restphosphor ein; derselbe wird bestimmt entweder als Differenz zwischen der Menge, die in verdünntem Serum mit Magnesiamixtur in der Kälte direkt gefällt werden kann, und der ganzen „säurelöslichen" Menge, oder direkt, indem er zum Pikrinsäurefiltrat Magnesiamixtur setzt, um das ionisierte Phosphat zu fällen, wonach die Mutterlauge 1—2 Stunden bei 110° autoklaviert wird und wiederum zum Auskrystallisieren hingestellt wird, wodurch der jetzt abgespaltene Restphosphor gefällt wird. Feigl findet, daß etwa 15% des „säurelöslichen Phosphors" Restphosphor darstellen, eine Größe derselben Ordnung wie diejenige, die nach Greenwald indyalisabel ist.

Bloor benutzt gleichfalls bei den Phosphorbestimmungen die Nephelometrie, aber er benutzt zur Fällung und Extraktion von Blut und Plasma eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung, die 2,5% Eisessig enthält. Im Filtrate bestimmt er das anorganische Phosphat, indem er davon ausgeht, daß nur der als anorganisches Phosphat vorhandene Phosphor bei Zimmertemperatur als Strychninphosphormolybdat gefällt wird. Der gesamte „säurelösliche Phosphor" wird in ähnlicher Weise im Filtrat bestimmt, nachdem die darin vorhandenen organischen Bestandteile mit Schwefelsäure und Salpetersäure destruiert worden sind.

Bloor hat auch die Menge von Phosphor in den Blutkörperchen bestimmt, die er sich verschafft, indem er abzentrifugiert und 1 mal mit einer 0,9 proz. NaCL-Lösung wäscht. Bei 16 gesunden Männern fand er

[1]) J. Greenwald, Journ. of Biol. Chem. 25, 431. 1916.
[2]) Feigl, Diese Zeitschr. 83, 81 und 86. 1917.
[3]) Bloor, Journ. of Biol. Chem. 36, 33 und 49. 1918.

die in der Tabelle I[1]) angegebenen Werte von „säurelöslichem" und anorganischem Phosphor in Plasma und Blutkörperchen.

Tabelle I.

	P. pro 100 ccm			
	Plasma		Blutkörperchen	
	säurelöslich	anorganisch	säurelöslich	anorganisch
Mindestens	2,9	1,9	44	3,8
Mittel	3,2	2,7	59	5,8
Höchstens	4,3	3,8	78	8,5

Bloors Resultate in betreff des Verhältnisses zwischen „säurelöslichem" und „anorganischem" Phosphor im Plasma entsprechen den Angaben von Greenwald und Feigl, indem die Differenz (Feigls Restphosphor) etwa 10% beträgt. In den Blutkörperchen findet er doppelt so viel anorganischen (ionisierten) Phosphor als im Plasma.

Bloor meint, daß das Vorhandensein von anorganischem Phosphat in den Blutkörperchen und dem Plasma hinlänglich bewiesen worden ist, da die Fällung und die Extraktion mit einer schwach sauren Ammoniumsulfatlösung stattfindet, und da bei Zimmertemperatur Niederschlag eintritt mit einem Reagens, das vermeintlich nur anorganisches Phosphat fällt. Die einzige Möglichkeit eines Irrtums, meint er, liegt darin, daß die Ammoniumsulfatlösung während der Zeit, in welcher extrahiert wird, Phosphat abspalten kann; da es sich aber nur um etwa 10 Minuten handelt, spielt dies seiner Meinung nach keine Rolle.

Sowohl Greenwalds, Feigls als Bloors Untersuchungen scheinen zu zeigen, daß der im Plasma vorhandene „säurelösliche Phosphor" zum allergrößten Teil (etwa 90%) als anorganisches Phosphat vorhanden ist.

Nach meinen eigenen Untersuchungen scheint Bloors Angabe der anorganischen Phosphatmenge in den Blutkörperchen mir dagegen nicht ganz überzeugend zu sein.

Bei meinen Untersuchungen benutzte ich zur Bestimmung des Phosphors eine Fällung desselben als Phosphorammoniummolybdat. Die Fällung suchte ich direkt aus dem Filtrat der Extraktionslösung zu bewerkstelligen, weshalb ich als Extraktionsflüssigkeit eine 3proz. Sublimatlösung benutzte, die 0,25% Salzsäure enthielt. Eine solche Lösung fällt und extrahiert nämlich das Blut vorzüglich, und man kann daraus zugesetzte Phosphatmengen ebenso leicht und in derselben Weise fällen und quantitativ bestimmen, als wenn sie im Wasser gelöst wären.

[1]) Die Zahlen sind von mir aus H_3PO_4 in P umgerechnet worden durch Division durch 3,2.

Zu den Versuchen benutzte ich meist frisches Kaninchenblut, 0,5 ccm zu 20 ccm Sublimatlösung; ich extrahierte eine Stunde lang und filtrierte dann einen gewissen Quotateil ab, der zur Bestimmung benutzt wurde. Zu diesem Quotateil (15 ccm) setzte ich Schwefelsäure und Ammoniumnitrat in angemessener Menge, erwärmte bis zu beginnendem Kochen und fällte bei etwa 80° mit Ammoniummolybdat, wie bei einer gewöhnlichen Analyse. Es ergab sich nun immer ein gelber Niederschlag von Phosphorammoniummolybdat, der nach einem Stehenbleiben von einigen Stunden in der Kälte abfiltriert wurde, wonach die Phosphormenge im Niederschlag bestimmt wurde. Die in der Weise gefundene Phosphormenge entsprach 5—7 mg pro 100 ccm Blut.

Kochte man aber die aus dem gelben Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit einige Minuten lang, oder stellte man sie einige Stunden bei 60° in den Thermostaten, wurde ein neuer gelber Niederschlag gefällt, der nach Analysierung und mit der zuerst gefällten Menge zusammengelegt nun etwa 20 mg Phosphor pro 100 ccm ergab. Da das Blut, wie andere Untersuchungen zeigten, tatsächlich etwa 30 mg „säurelöslichen Phosphor" enthielt, sieht man, daß die Abspaltung noch keine vollständige ist.

Da es sich nun im voraus gezeigt hatte, daß man zugesetzte Phosphatmengen in der Fällungsflüssigkeit leicht und quantitativ wie in einer gewöhnlichen wässerigen Lösung fällen konnte, so zeigten diese Versuche, daß man bei diesem Verfahren nicht imstande ist, das anorganische Phosphat von den übrigen „säurelöslichen" Verbindungen zu unterscheiden. Die Versuche zeigten ferner, daß in dem untersuchten Blut höchstens 5—7 mg und im Serum höchstens etwa 3 mg Phosphor pro 100 ccm von dem anorganischen Phosphat herrühren konnten, und daß der übrige „säurelösliche" Teil nicht besonders stabil war, sondern leicht Phosphatgruppen abspaltete.

Nach Fällung des Filtrats mit Schwefelwasserstoff und Abfiltrierung des gebildeten Quecksilbersulfids kann man nach Destruktion mit Schwefelsäure und Salpetersäure die Gesamtmenge von „säurelöslichem Phosphor" bestimmen, die im Kaninchenblut etwa 30 mg pro 100 ccm betrug. Versuche, das Filtrat mit Äther oder Chloroform auszuschütteln, zeigten, in Übereinstimmung mit Bloors und Greenwalds Untersuchungen, daß der „säurelösliche Phosphor" nicht in Lösung tritt.

Da es in dieser Weise nicht gelang, das anorganische Phosphat auszuscheiden, versuchte ich, ob es nicht gelingen möchte, wenn man das Filtrat durch Zusatz von Natriumacetat essigsauer machte und darauf bei Zimmertemperatur mit Uranacetat fällte, das sowohl in einer wässerigen Lösung als in der Fällungsflüssigkeit die darin vorhandenen anorganischen Phosphate fast momentan fällt.

Es zeigte sich, daß das nichtionisierte Phosphat, im Gegensatz zu dem ionisierten, vom Uranacetat nicht momentan gefällt wird; die Fällung geschah jedoch recht schnell, so daß 5—10 Minuten nach dem Uranacetatzusatz bei Zimmertemperatur soviel Phosphor gefällt worden war, daß im Filtrat nach Destruktion sowohl aus Serum als aus Blut nur Spuren von Phosphor übrig waren.

Das Resultat meiner Untersuchungen fordert zu Vorsicht auf bei der Beurteilung von Bloors Angaben über die Menge des anorganischen Phosphors in den Blutkörperchen, denn es ergibt sich aus meinen Untersuchungen, daß sich in dem „säurelöslichen Phosphor“ Stoffe von einem recht labilen Charakter finden, die ihre Phosphatgruppen sehr leicht abgeben.

Da es mir nach meinen Untersuchungen zweifelhaft schien, ob es zur Zeit möglich ist, die verschiedenen Fraktionen des „säurelöslichen Phosphors“ im Blut mit voller Sicherheit zu unterscheiden, habe ich mich in meinen folgenden Untersuchungen darauf beschränkt, nur die gesamte „säurelösliche“ Phosphormenge teils im Blut und teils im Plasma zu bestimmen.

I. Untersuchungen über den „säurelöslichen Phosphor“ in Blut und Plasma (Serum) bei verschiedenen Tieren.

Als Fällungsflüssigkeit benutzte ich eine Lösung, die 0,5% Pikrinsäure und 0,25% Salzsäure enthält; mit 20 ccm von dieser Flüssigkeit fälle ich das Blut (in der Regel 0,5 ccm) und extrahiere eine Stunde lang. Daß dies genügt, und daß noch größere Salzsäuremengen keine phosphorhaltigen Bestandteile mehr extrahieren, ergibt sich aus Tabelle II.

Es zeigte sich ferner, daß man bei einer Extraktion bei 0°, wie bei einer solchen bei 50° dasselbe Resultat erhielt.

Bei meinen Versuchen habe ich die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Blut und im Serum oder Plasma von fol-

Tabelle II.

Nr.	Pikrinsäurelösung	Extraktionszeit	mg P. pro 100 ccm
1	in 0,25% HCl	1 Stunde	27,5
2	in 0,25% HCl	10 Stunden	27,7
3	in 1,3% HCl	1 Stunde	27,0
4	in 1,3% HCl	10 Stunden	27,8

genden Tieren untersucht: Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Katze, Hund, Rind und Taube, und habe in vielen Fällen eine größere Reihe von Bestimmungen unternommen. Bei einem Teil der genannten Tiere sind diese Verhältnisse nicht früher untersucht worden, in betreff der übrigen liegen nur sehr wenige Untersuchungen vor. Ich habe die wichtigsten der vorliegenden Angaben in Tabelle III zusammengestellt. Zu Abderhaldens Angaben ist zu bemerken, daß ich seine Resultate aus Gew.-% in Vol.-% umgerechnet habe, und daß seine Analysen von Katzen- und Kaninchenblut an einer Mischung von Blut aus bzw. 3 und 12 Tieren ausgeführt wurden.

Tabelle III.

Autor	Tier	mg P. pro 100 ccm		
		Blut	Plasma	Serum
Abderhalden	Kaninchen	31,9		2,1
"	Katze	25,4		3,3
"	Hund I	27,0		3,8
"	Hund II	26,6		3,7
"	Rind	7,8		3,9
Greenwald	Hund	29,0		2,7
"	"	23,9		4,4
"	"	19,2		4,6
Bloor	Rind	10,3	7,7	

Die von mir angestellten Untersuchungen sind in Tabelle IV zusammengestellt. Das Blut war in keinem Falle Mischungsblut; jede Bestimmung rührt von einem einzelnen Tiere her.

Ferner habe ich in einer Reihe von Fällen allein die Menge von „säurelöslichem Phosphor" im Plasma bestimmt. Bei Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen fand ich folgende Werte pro 100 ccm Plasma:

Ratte 5,4; 4,8; 6,1.
Meerschweinchen 4,7; 4,6; 4,1.
Kaninchen 3,6; 3,8; 4,6; 3,4; 2,5; 3,2; 3,9.

Tabelle IV.

Tier	mg P. pro 100 ccm		
	Blut	Plasma	Serum
Kaninchen	28,5		2,5
"	28,9		1,9
"	29,2		2,0
"	27,9		2,4
"	28,8		
"	27,6		
"	27,5		
"	33,4	3,3	
"	28,6	3,1	
"	24,6	3,8	
"	27,8	2,5	
"	31,0	1,5	
Meerschweinchen . .	21,5		4,5
" . .	24,4		5,6
" . .	24,9		5,2
" . .	24,9		
Ratte	31,6		
"	33,1		5,1
"	34,1		5,3
Katze	9,1		10,3
"	12,2		9,9
"	9,8		2,4
Hund	21,0		2,4
Rind	6,6		4,4
Taube	48,1[1])		1,7
"	65,2		4,8

Schließlich fand ich in einer einzelnen Analyse von Pferdeserum 2,5 mg pro 100 ccm.

Betrachten wir zuerst die Verhältnisse beim Kaninchen, bei welchem Tiere die größte Anzahl von Untersuchungen ausgeführt wurde, so zeigt es sich, daß die Menge von „säurelöslichem Phosphor" bei verschiedenen Individuen nicht unerheblich schwankt. So schwankt die Menge im Blut von 24,6 bis auf 33,4 mg, in Serum und Plasma von 1,5 bis auf 4,6 mg pro 100 ccm. Das Blut rührt von Tieren her, die unter ganz denselben Verhältnissen lebten. Die gefundenen Zahlen stimmen, was das Blut betrifft, mit den Abderhaldenschen gut überein, aber das Mittel meiner Bestimmungen in Serum und Plasma — 3,0 mg — liegt etwas höher als der von Abderhalden im Durchschnittsblut von 12 Kaninchen gefundene Wert von 2,1 mg.

[1]) Beim Defibrinieren entstand ein kleines Koagulum im Blute, weshalb der hier angesetzte Wert zu klein ist.

Die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ in Meerschweinchenblut ist etwas geringer als in Kaninchenblut. In Serum und Plasma wurden dagegen durchgehends etwas höhere Werte gefunden als beim Kaninchen.

Bei der Ratte ist die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Blute (31,6—34,1 mg) bedeutend größer als beim Meerschweinchen und etwas größer als beim Kaninchen. Die in Serum und Plasma gefundenen Werte (4,8—6,1 mg) liegen bedeutend höher als beim Kaninchen.

Eine einzelne Bestimmung an Hundeblut und Hundeserum ergab Werte (21,0 bzw. 2,4 mg), die mit den von Abderhalden und Greenwald angegebenen Werten gut übereinstimmen.

Während es dem Blut der bisher besprochenen Tiere gemeinsam ist, daß die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Blute weit größer ist — meist 5—10 mal so groß — als die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Serum, wies das Rinderblut ganz andere Verhältnisse auf, indem in bzw. 100 ccm Blut und 100 ccm Serum 6,6 und 4,4 mg „säurelöslicher Phosphor“ gefunden wurden. Diese Bestimmung stimmt mit der Abderhaldenschen (7,8 bzw. 3,9) ganz überein. Bloor gibt etwas höhere Zahlen (10,3 bzw. 7,7) an. Es geht mit Sicherheit aus diesen Untersuchungen hervor, daß die Rinderblutkörperchen eine weit geringere Menge von „säurelöslichem Phosphor“ enthalten als die Blutkörperchen von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Hund.

Bei der Katze fand Abderhalden ähnliche Werte wie beim Hunde (25,2 und 3,5 mg in 100 ccm Blut und Serum). Bei meinen Untersuchungen schwankten bei 3 Tieren die Werte im Blut von 9,1 bis auf 12,2 und im Serum von 2,4 bis auf 10,5 mg pro 100 ccm. Im Serum fand ich bei der Katze weit größere Schwankungen der Menge von „säurelöslichem Phosphor“ als bei irgendeinem von den andern untersuchten Tieren, und die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ in den Blutkörperchen ist sehr gering, in zwei von den Fällen findet sich ungefähr dieselbe Menge in den Blutkörperchen wie im Serum. Es wurden in diesen Fällen Doppeltanalysen angestellt, die gut übereinstimmten. Meine Untersuchungen stimmen durchaus nicht mit der einzigen vorliegenden Angabe von Abderhalden (25,2 und 3,5 mg in 100 ccm Blut und Serum), und dieser Gegensatz läßt sich nicht daraus

erklären, daß Abderhaldens Bestimmung an einer Mischung von Blut aus 3 Katzen ausgeführt wurde.

Von besonderem Interesse sind die beiden an Blut von Tauben angestellten Untersuchungen. Während die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Serum ungefähr dieselbe war (1,7 und 4,8 mg) wie bei den untersuchten Säugetieren, wurden im Blut weit höhere Werte (48,1 und 65,2 mg pro 100 ccm) gefunden als bei letzteren. Es wird von Interesse sein, zu untersuchen, ob die Menge von „säurelöslichem Phosphor“ im Blute anderer Vögel ähnliche Verhältnisse aufweist.

Bei den verschiedenen untersuchten Tieren haben sich physiologische Schwankungen des „säurelöslichen Phosphors“ im Plasma ergeben, die den bereits beim Menschen (Bloor, Greenwald, Feigl) gefundenen analog sind.

II. Untersuchungen über die Toxikologie der Phosphate.

Die folgenden Untersuchungen behandeln die Giftwirkungen der verschiedenen Phosphate auf Kaninchen und Meerschweinchen. Bei den Kaninchen habe ich Serienbestimmungen der Phosphatmenge im Plasma während der Vergiftung unternommen; bei den Meerschweinchen habe ich die Konzentration im Plasma beim Eintreten des Todes bestimmt.

Das Plasma gewann ich, indem ich einige Kubikzentimeter Blut aus der A. carotis in ein kleines Reagensglas mit Natriumoxalat hinüberströmen ließ und unmittelbar darauf zentrifugierte.

Die toxischen Eigenschaften der Phosphate sind bisher nur wenig untersucht worden.

Gamgee, Priestley und Larmuth[1]) haben 1887 gezeigt, daß die Pyro- und Metaphosphate Herzgifte sind, und daß die Pyrophosphate am stärksten wirken, während die Orthophosphate für das Herz nicht giftig sind. Schultz[2]) fand, daß subcutan injiziertes Pyrophosphat doppelt so giftig ist wie Metaphosphat. Schließlich haben Starkenstein[3]) und Greenwald[4]) sich mit der Frage beschäftigt.

Starkenstein sucht in seiner Arbeit zu zeigen, daß die Toxizität der verschiedenen Phosphate von ihren calciumfällenden Eigenschaften

[1]) Gamgee, Priestley and Larmuth, Journ. of Anat. and Phys. **11**, 255. 1887.

[2]) Schultz, Archiv f. exp. Pathol. und Pharmakol. **18**, 176. 1884 und **23**, 150. 1887.

[3]) Starkenstein, ebenda **77**, 47. 1914.

[4]) Greenwald, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. **7**, 57. 1915.

abhängig ist. Das Vergiftungsbild ähnelt, nach Starkenstein, der Oxalatvergiftung; es treten Diarrhöe, Konvulsionen, schnelle Respiration ein, und die Tiere sterben an Herzlähmung. Per os und subcutan eingegeben besitzen nach Starkenstein alle 3 Salze dieselbe Toxizität, und er meint, daß dies darauf beruht, daß der Organismus imstande ist, die Pyro- und Metaphosphate in Orthophosphate umzuwandeln. Intraperitoneal eingegeben, sind die Pyrophosphate seinen Befunden gemäß doppelt so giftig wie die Orthophosphate, und die Giftigkeit der Metaphosphate liegt zwischen der der beiden anderen.

Bei intravenöser Injektion tritt der Unterschied der Toxizität der 3 Salze sehr stark hervor. Starkenstein findet, daß man an Kaninchen per Kilogramm

90 ccm n/5-Orthophosphatlösung,
6,5 „ n/5-Metaphosphatlösung,
5,2 „ n/5-Pyrophosphatlösung

intravenös injizieren muß, um den Tod hervorzurufen. Die Krämpfe während der Vergiftung erklärt er als eine Folge der calciumbindenden Eigenschaften der Phosphate.

Dieser Resultate wegen nahm Greenwald die Frage von der Phosphatvergiftung zur Behandlung auf. Es sind von ihm 3 Versuche veröffentlicht worden.

I. Kaninchen, 2270 g, intravenöse Injektion von 208 ccm von einer Phosphatlösung M/5 Na_2HPO_4 (9 Teile) + M/5 NaH_2PO_4 (1 Teil) im Laufe von 65 Minuten. Der „säurelösliche Phosphor" stieg von 7,3 bis auf 151 mg pro 100 ccm Serum. Das Tier starb nicht.

II. Kaninchen, 2450 g, intravenöse Injektion von 125 ccm M/15 Na_3PO_4 im Laufe von 25 Minuten. Der „säurelösliche Phosphor" stieg von 4,5 bis auf 68,9 mg pro 100 ccm Serum. Das Tier starb.

III. Hund, 12700 g, intravenöse Injektion von 473 ccm M/15 Na_3PO_4 im Laufe von 49 Minuten. Der „säurelösliche Phosphor" stieg von 9,2 bis auf 38,4 mg pro 100 ccm Serum. Das Tier starb nicht.

Krämpfe wurden in keinem der Versuche beobachtet, die somit den Versuchen von Starkenstein widersprechen. Greenwald führte die Injektionen bei Lokalanästhesie aus, so daß eine universelle Narkose kein Hindernis hat darbieten können.

Weder bei Starkensteins noch bei Greenwalds Untersuchungen wurde den Tieren dieselbe Menge pro Zeiteinheit injiziert. Entweder waren die Injektionen intermittierend oder die Injektionsgeschwindigkeit stark schwankend. Aus dem Grunde treten sehr bedeutende Schwankungen der Konzentration der verschiedenen Phosphate im Serum während des Verlaufes der verschiedenen Versuche auf, und die Resultate sind nur schwer miteinander vergleichbar, indem dieselbe Menge des injizierten Stoffes je nach der Geschwindigkeit, mit welcher die Injektion vonstatten geht, verschieden wirken können.

Bei meinen eigenen Untersuchungen benutzte ich stets Urethannarkose, und ich kann mich somit nicht mit Sicherheit

über die Krämpfe aussprechen; aber ich beobachtete doch ab und zu trotz dieser Narkose Zuckungen an den Extremitäten und der Halsmuskulatur. Es war in erster Reihe meine Aufgabe, die Konzentration der Phosphate im Plasma während der Vergiftung und beim Tode zu untersuchen.

Bei der Ortho- und Metaphosphatvergiftung wurde meist zuerst eine Inzitation der Respiration beobachtet, die darauf bis zum schließlichen Stillstand immer langsamer wurde. Das Herz arbeitete in allen Fällen nach dem Respirationsstillstand. Bei der Pyrophosphatvergiftung wurde eine ausgesprochene Cheyne-Stockes sche Respiration beobachtet; die Respirationspausen wurden immer länger bis zum Respirationsstillstand; auch hier arbeitete das Herz noch nach diesem Zeitpunkt. Ich muß also von Starkensteins Auffassung, daß die Todesursache eine Herzlähmung sei, Abstand nehmen.

Es wurden folgende Versuche ausgeführt:

Kaninchen I, 3050 g. Urethan. Es werden aus der A. carotis d. Blutproben entnommen, und die Phosphatlösung wird kontinuierlich und gleichmäßig aus einer Prytzschen Pumpe durch die V. saphena d. injiziert. $2^h\,15'$ wird eine Normalprobe entnommen und $2^h\,29'-3^h\,43'$ werden 100 ccm 3,6 proz. $Na_2HPO_4(12\ H_2O)$-Lösung injiziert, im ganzen im Laufe von 88 Minuten 312 mg P,, d. h. pro Kilogramm und Minute 1,2 mg.

Das Tier war nur wenig durch die Injektion beeinflußt. Die Analysenresultate sind unten angeführt.

Uhr	Injiziert	mg P. per 100 ccm Plasma
2^h 15′ p. m.	00 ccm	2,4
2^h 52′	29 „	14,8
3^h 20′	67 „	22,3
3^h 43′	100 „	24,9
4^h 43′		17,9
7^h 00′		5,6
10^h 00′ a. m.		1,0

Man sieht, daß die Phosphatkonzentration im Plasma zu Anfang stark zunimmt, während der Zeit von $3^h\,20'$—$3^h\,43'$ aber nur sehr wenig, oder mit anderen Worten, daß das Tier während dieser Zeit aus dem Blut fast ebensoviel hinweggeschafft, wie injiziert wird. Unmittelbar nach dem Aufhören der Injektion finden sich 24,9 mg „säurelöslichen Phosphors“ per 100 ccm Plasma, nach einer Stunde eine so bedeutende Menge wie 17,9, und noch $3^1/_4$ Stunden nach dem Aufhören der Injektion liegt

eine bedeutende Phosphatämie vor. Es zeigt sich also, daß die injizierten Phosphate das Plasma (den Organismus) nur langsam verlassen, und daß viele Stunden verstreichen, bevor wieder die normale Konzentration vorliegt.

Wie erwähnt, war das Tier während des Versuches nur sehr wenig beeinflußt; aber die Plasmaanalysen zeigen doch, daß die Phosphatkonzentration bis zum 10fachen der normalen Konzentration zugenommen hat. Der nächste Kaninchenversuch wird die geringe Giftigkeit der Orthophosphate noch deutlicher dartun.

Kaninchen II, 2100 g, Urethan. Nephrectomia duplex. Blutprobe aus der A. carotis d. Injektion durch die V. saphena d. Von 2^h 13′—4^h 05′ wurden dem Tier 152 ccm einer 7,2 proz. Na_2HPO_4-Lösung injiziert, im ganzen 942 mg P., d. h. pro Kilogramm und Minute 4,0 mg.

Uhr	mg P. pro 100 ccm Plasma
2^h 12′	2,5
2^h 14′	9,4
2^h 27′	37,6
3^h 10′	72,6
3^h 26′	88,4
3^h 48′	108
4^h 05′	119

Der Tod trat 4^h 05′ ein wegen Respirationstillstandes, und das Plasma wies zu diesem Zeitpunkt eine Phosphatkonzentration auf, die etwa 50 mal höher war als die normale. Daß die Konzentration im Plasma bereits nach einer Injektion von etwa 1 ccm bis auf 9,4 mg ansteigt, beruht darauf, daß das Blut von der V. saphena, in welche injiziert wurde, und bis zur A. carotis, aus der die Blutprobe entnommen wurde, nur das Herz und den Lungenkreislauf passiert hat.

Bei einigen zu anderen Zwecken angestellten Untersuchungen, die in einer folgenden Abhandlung mitgeteilt werden sollen, fand ich, daß die prozentuale Zunahme des Plasmas im Blute sogar nach einer Injektion von recht großen Mengen 7,2 proz. Orthophosphatlösung nur gering ist, sogar an nephrektomierten Kaninchen. Das Kaninchen von Versuch II wog 2100 g; nimmt man an, was nach den angestellten Untersuchungen sicherlich zu hoch ist, daß die Plasmamenge nach der Injektion auf 100 ccm gestiegen ist, so enthält dieselbe 119 mg „säurelöslichen Phosphor" beim Eintreten des Todes; davon machen 116,5 mg die durch die Injektion verursachte Zunahme aus. Da aber 942 mg Phosphor

injiziert worden sind, haben die Gewebe also 826 mg aufgenommen, indem die Blutkörperchen nur verhältnismäßig kleine Mengen aufnehmen. Der Versuch zeigt also, daß bei weitem der größte Teil der injizierten Phosphate sehr schnell das Plasma verläßt, um in den Geweben Aufnahme zu finden.

Wie nebenstehende Kurve zeigt, ist die Steigerung der Phosphatkonzentration im Plasma eine ganz gleichmäßige, von der allerersten Zeit nach der Injektion abgesehen, s. o. Die gradlinige Form der Kurve zeigt, daß die Gewebe ganz ebenmäßig einen Teil des injizierten Phosphates aufnehmen, so daß die Steigerungen der Phosphatkonzentration in den Geweben und im Plasma miteinander proportional verlaufen müssen.

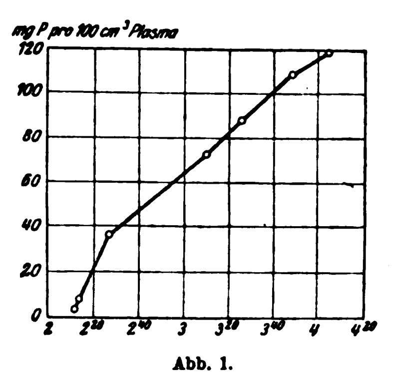


Abb. 1.

Die Untersuchungen an Meerschweinchen wurden an Tieren ausgeführt, die 750—900 g wogen; vor dem Versuche wurden 5—6 ccm 20 proz. Urethan subcutan injiziert, und es wurde in die A. carotis d. eine Kanüle eingeführt. Darauf wurden intraperitoneal Lösungen der verschiedenen Phosphate injiziert, worauf die Tiere beobachtet wurden. Da die Tiere, denen Orthophosphat injiziert worden war, trotz sehr großer Gaben nicht sofort starben, wurden nach einer gewissen Zeit aus der A. carotis Blutproben entnommen. Auch an den Tieren, die nach der Injektion starben, wurden aus der A. carotis d. Blutproben entnommen, indem das Blut durch die Kanüle hinausgepreßt wurde.

Die Versuchsresultate sind in Tabelle V verzeichnet.

Tabelle V.

Intraperitoneal injiziert	Gewicht des Tieres	mg P. pro 100 ccm Plasma	Bemerkungen
7,2% Na_2HPO_4 20 ccm .	900	9,5	nach 80 Min. getötet.
10% Na_2HPO_4 40 ccm .	800	57,2	„ 100 „ „
6% $Na_4P_2O_7$ 10 ccm . .	850	18,8	starb nach 25 Minuten.
6% $Na_4P_2O_7$ 15 ccm . .	850	19,2	„ „ 20 „
5% $Na_3(PO_3)_3$ 15 ccm . .	720	56,4	„ „ 75 „
5% $Na_3(PO_3)_3$ 25 ccm . .	850	45,3	„ „ 115 „

Diese Versuche zeigen, daß sogar große Orthophosphatgaben, welche die Plasmaphosphatkonzentration bis auf 67,2 mg

Phosphor pro 100 ccm oder 10 mal die Norm steigern, bei Meerschweinchen nicht den Tod verursachen, ja diese Tiere waren sogar nur ganz wenig beeinflußt, was ganz damit übereinstimmt, daß das Tier im Kaninchenversuch II erst bei einer Konzentration von 119 starb.

Bei den Pyro- und Metaphosphaten liegt die Sache anders, indem die Tiere nach der Injektion starben. Nach Pyrophosphatinjektionen sterben die Tiere, wenn die Konzentration von „säurelöslichem Phosphor" etwa 20 mg pro 100 ccm Plasma erreicht hat, und nach Metaphosphatinjektionen nach einer Konzentration von etwa 50. — Die früheren Angaben, daß die Orthophosphate nur wenig giftig, die Pyro- und Metaphosphate aber recht giftig sind, und zwar von diesen Phosphaten die Pyrophosphate am meisten, wird durch diese Versuche vollständig bestätigt. Jedoch scheinen die Pyrophosphate weit giftiger zu sein im Verhältnis zu den Metaphosphaten, als dies aus Starkensteins Angaben hervorgehen könnte.

Daß die Vermehrung von „säurelöslichem Phosphor", die wir nach intraperitonealer Injektion von Meta- und Pyrophosphaten im Plasma vorfinden, ausschließlich von den Phosphationen dieser Salze herrührt, ist nicht absolut sicher, da die Möglichkeit nicht auszuschließen ist, daß der Organismus etwas in die ungiftige Orthoverbindung umgewandelt hat, wie Starkenstein es ohne festen Anhalt bei der subcutanen Injektion dieser Salze annimmt. Es liegt indessen außer jedem Zweifel, daß die Todesursache in einer Anhäufung von Meta- und Pyrophosphaten besteht, da die Tiere ja nicht bei der erreichten Phosphatkonzentration sterben würden, wenn es sich um Orthophosphationen handelte.

Anhang.

In Verbindung mit einer früheren Abhandlung[1]) habe ich eine Arbeit von Kleinmann[2]) besprochen, in welcher dieser Forscher angibt, daß es bei Neumanns Methode zur Phosphorbestimmung notwendig ist, den gelben Niederschlag von Phosphorammoniummolybdat mit 50 proz. Alkohol statt mit kaltem Wasser zu waschen, da der Niederschlag hierin etwas löslich ist. Wenn man mit Wasser wäscht, muß man seinen Angaben nach den von Heubner angegebenen Faktor 0,57 statt des theoretisch berechneten 0,554 benutzen; wäscht man aber mit 50 proz. Alkohol, so stimmt letzterer Faktor.

[1]) Diese Zeitschr. **104**, 15 u. 22. 1920.

[2]) Diese Zeitschr. **99**, 95. 1919.

Sein Analysenmaterial ist in diesem Punkt nur gering, und man kann namentlich dagegen einwenden, daß er die Phosphormenge in seinen Analysen nicht variiert hat, was als ganz unerläßlich zu betrachten ist, wenn man den Rechnungsfaktor bestimmen will, und wenn die Löslichkeitsfrage einer Untersuchung unterworfen wird.

Meine Untersuchungen auf Grund einer sehr großen Anzahl von Titrationen taten mit Sicherheit dar, daß die Analysen vollständig korrekte Resultate ergaben, wenn man den Niederschlag mit Wasser wusch und mit dem theoretischen Faktor rechnete.

Nachdem Kleinmanns Mitteilung veröffentlicht worden war, habe ich eine Reihe Untersuchungen angestellt, um die Resultate zu vergleichen, die nach einem Waschen des Niederschlags mit Wasser und nach einem Waschen mit Alkohol gewonnen werden.

Die Versuche wurden ausgeführt sowohl mit großen Phosphormengen (Makroanalysen) als mit kleinen Phosphormengen (Mikroanalysen); sie sind in Tabelle A und Tabelle B zusammengestellt.

Tabelle A. Makroanalysen.

mg P.			Gewaschen mit
Berechnet	Gefunden	Fehler	
3,03	3,04	+ 0,01	50 proz. Alkohol
3,03	2,99	÷ 0,04	Wasser
6,06	6,10	+ 0,04	50 proz. Alkohol
6,06	6,08	+ 0,02	Wasser
12,12	12,15	+ 0,03	50 proz. Alkohol
12,12	12,18	+ 0,06	Wasser
18,18	18,17	÷ 0,01	50 proz. Alkohol
18,18	18,12	÷ 0,06	Wasser

Tabelle B. Mikroanalysen.

0,038	0,040	+ 0,002	50 proz. Alkohol
0,038	0,037	÷ 0,001	Wasser
0,076	0,074	÷ 0,002	50 proz. Alkohol
0,076	0,078	+ 0,002	Wasser
0,152	0,151	÷ 0,001	50 proz. Alkohol
0,152	0,154	+ 0,002	Wasser
0,152	0,155	+ 0,003	50 proz. Alkohol
0,152	0,154	+ 0,002	Wasser

Die Genauigkeit der Analysen ist ganz dieselbe, es sei, daß das eine oder das andere Waschmittel angewandt wird. Die Abweichungen von der berechneten Phosphormenge fallen ungefähr gleichmäßig zu beiden Seiten derselben, und die sind einander ganz gleich, es sei, daß mit Alkohol oder mit Wasser gewaschen wird, wie auch bei Anwendung von großen oder von kleinen Phosphormengen.

Man darf aus diesen Analysen schließen, daß es, um bei der hier besprochenen Methode Analysenresultate zu gewinnen, die, wenn man mit dem theoretischen Faktor rechnet, der tatsächlich vorhandenen Phosphormenge genau entsprechen, nicht notwendig ist, den Niederschlag mit Alkohol zu waschen.

Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse.

I. Sublimathärtung und Sublimathämolyse.

Von

H. Bechhold und **W. Kraus.**

(Aus dem Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. M. [Direktor: Prof. Dr. Bechhold].)

(Eingegangen am 21. Juni 1920.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In einer früheren Untersuchung wurde auf die seit P. Ehrlich bekannte Erscheinung hingewiesen, daß bei der Einwirkung von $HgCl_2$ auf rote Blutkörperchen in höheren Konzentrationen Härtung, in niederen Konzentrationen Lösung, Hämolyse, erfolgt, und es konnte der Nachweis geführt werden, daß die Härtung eine Wirkung der Hg-Ionen, die Eiweiß fällen, daß die Hämolyse wahrscheinlich eine Wirkung der Hg - Molekel ist[1]). Diese Beobachtungen schienen uns einen neuen Weg zu bieten, um Einblick zu gewinnen in den Bau der Erythrocyten. Besonders lag uns daran, eine Brücke zu schlagen von der rein chemischen Forschung im Reagensglas zu den mit dem Auge verfolgbaren, also histologischen Veränderungen des einzelnen Erythrocyten, wozu die Prüfung mit dem Ultramikroskop einlud.

Durch Auswahl geeigneter Reagenzien hatten wir es in der Hand, die einzelnen Bestandteile der roten Blutkörperchen sowohl getrennt als auch zusammen zu beeinflussen. In dem Sublimat hatten wir eine Substanz, die Eiweiß koagulierte, in Lipoiden löslich ist und von der wir auch festgestellt hatten, daß es auf

[1]) Über die Hämolyse durch Quecksilber und Quecksilberverbindungen. (Veröffentlichungen aus dem Institut für experimentelle Therapie herausgeg. v. W. Kolle. 1920.)

Eiweißkörper stark entquellend wirkt. Es war somit die Möglichkeit geboten, die eiweißartigen Bestandteile des roten Blutkörperchens zu beeinflussen, d. h. mehr oder weniger zu festigen, ohne, wie wir damals annahmen, die Struktur der Lipoide zu verändern. Indem wir das Sublimat auf die Blutkörperchen in hyper- oder hypotonischen Lösungen wirken ließen, konnten wir unter der Einwirkung osmotischer Kräfte ein Bild gewinnen, welches der Strukturbestandteile gegenüber dem normalen Blutkörperchen Abweichungen aufwies.

Da uns auch andere Salze zur Verfügung standen, welche sowohl Eiweißkörper als auch Lipoide fällen ($CuCl_2$, $FeCl_3$), da wir ferner mit Stoffen operieren konnten, die nur die Lipoide verändern (Saponin), so waren wir in der Lage, auf jedes der in Frage kommenden Strukturelemente zu wirken. Ultramikroskopische Beobachtungen lehrten uns, daß sich die Veränderungen im ultramikroskopischen Bild deutlich verfolgen lassen. Es war somit die von uns gewünschte Möglichkeit geboten, die im Reagensglas sichtbaren Veränderungen an der Strukturänderung im ultramikroskopischen Bild zu kontrollieren.

Methodik.

Es wurden 5% Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung mit den entsprechenden Mengen von in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem $HgCl_2$ versetzt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Gewichtsprozente.

Die ultramikroskopischen Untersuchungen wurden zunächst in der Zeissschen Quarzkammer, späterhin der Einfachheit halber auf Objektträgern unter einem Deckgläschen vollzogen. Die Versuchsresultate sind in beiden Fällen die gleichen, nur empfiehlt es sich, die Untersuchungen, insbesondere die auf Objektträgern, nicht lange auszudehnen, sonst bekommt man trotz Vorschaltung eines Trogs mit Kupfersulfatlösung wohl durch Verdunsten von Wasser infolge der Wärmewirkung verzerrte Bilder. Ferner spielen nach Verdunsten des das Deckgläschen tragenden Wassers auch Druckwirkungen des Deckgläschens eine Rolle. Die Untersuchungen wurden sofort nach Sublimatzusatz und dann nach 24^h Einwirkung des Wassers auf die mit $HgCl_2$ behandelten roten Blutkörperchen untersucht.

Ehe wir in die Besprechung der Ergebnisse der ultramikroskopischen Untersuchungen eintreten, mögen einige Überlegungen vorausgeschickt werden über die Einwirkung des Sublimates. Es sei betont, daß osmotische Einflüsse, an die man vielleicht wegen der Zugabe des in physiolog. NaCl gelösten $HgCl_2$ denken könnte, nicht in Betracht kommen. Einer 0,58 proz.

NaCl ($^1/_{10}$ molekular) Lösung ist theoretisch (die Beeinflussung durch die geringe Ionisation des $HgCl_2$ nicht mit berücksichtigt) isotonisch eine 5,4% $HgCl_2$-Lösung. Umgerechnet auf 0,85% NaCl erhöht sich der Wert beim Sublimat auf 7,8%. Da wir die Untersuchungen in den $HgCl_2$ Konzentrationen 0,5% bis 0,0005% ausführten, kommen osmotische Überdrucke nicht in Betracht. Außerdem beweisen die Erscheinungen in den höheren $HgCl_2$ Konzentrationen, daß Sublimat in die Zelle eindiffundiert. — Die Anschauung, daß bei den zu schildernden Veränderungen osmotische Wirkungen ausscheiden, wurde bestätigt durch die Untersuchung der Einwirkung von $FeCl_3$- und $CuCl_2$-Lösungen, die auf Grund von Gefrierpunktbestimmungen mit physiologischer Kochsalzlösung isotonisch waren. Wir konnten bei diesen isotonischen Lösungen im wesentlichen die gleichen Erscheinungen konstatieren, wie in den höheren Konzentrationen, die durch Zugabe von $FeCl_3$ oder $CuCl_2$ zu physiologischer NaCl-Lösung bereitet waren.

Untersucht man die Wirkung des Sublimates auf 5% Blutkörperchenaufschwemmung, so findet man von $HgCl_2$ 1: 200 bis $HgCl_2$ 1:2400 im wesentlichen irreversible Härtung, d. h. die Blutkörperchen sind im Wasser nicht mehr hämolysierbar, von $HgCl_2$ 1:4000—$HgCl_2$ 1:200 000 Hämolyse. Die Farbe der irreversibel gehärteten Blutkörperchen ist kaffeebraun.

In Nachstehendem bedeutet +++ vollkommene, ++ teilweise, + geringe Hämolyse.

5% Blutkörperchen nach 1h Brutschrank, 24h Eisschrank.

$HgCl_2$		
1 : 200	0	irreversibel
1 : 400	0	irreversibel
1 : 800	0	irreversibel
1 : 1200	0	irreversibel
1 : 1600	Spürchen	irreversibel
1 : 2000	Spur	irreversibel
1 : 2400	0	irreversibel
1 : 4000	+++	
1 : 8000	+++	
1 : 16000	+++	
1 : 32000	+++	
1 : 40000	+++	
1 : 80000	++	
1 : 100000	+	
Kontrolle	0	

Untersucht man die Einwirkung des $HgCl_2$ auf ca. 1,6% *Hämoglobinlösung* in physiolog. NaCl, die ungefähr einer 5% Blutkörperchenaufschwemmung entspricht, so findet man bei den höheren $HgCl_2$-Konzentrationen vollkommene Ausfällung des Hämoglobins; über dem Niederschlag befindet sich eine farblose oder nur schwachgefärbte Flüssigkeit: Von $HgCl_2$ 1:4000 ab werden die Niederschläge geringer, die überstehende Flüssigkeit ist stark gefärbt.

Einwirkung von $HgCl_2$ auf ca. 1,6% Hämoglobinlösung in physiolog. NaCl. Es bedeuten ⊕⊕⊕ vollkommene Ausflockung, ⊕⊕ teilweise Ausflockung, ⊕ geringe Ausflockung.

Sublimat	sofort
1 : 200	⊕⊕⊕
1 : 800	⊕⊕⊕
1 : 1600	⊕⊕⊕
1 : 4000	⊕⊕⊕ – ⊕⊕
1 : 8000	⊕⊕⊕ – ⊕⊕
1 : 32000	⊕
1 : 80000	Spürchen
1 : 200000	0
1 : Kontr.	0

Nach 24^h fast das gleiche Bild.

Aus dem Vergleich dieser beiden Tabellen ersieht man, daß im Bereiche der $HgCl_2$-Konzentrationen, welche Blutkörperchen härten das gesamte Hämoglobin der Hämoglobinlösung niedergeschlagen wird; von der Konzentration $HgCl_2$ 1:4000 ab, in der bei den Blutkörperchen die Hämolyse einsetzt, wird das Hämoglobin nur mehr teilweise oder nur in sehr geringem Grade gefällt, die überstehende Flüssigkeit ist, wie bei der Blutkörperchenhämolyse, stark gefärbt. Infolge der stark fällenden Wirkung des $HgCl_2$ in den Konzentrationen von 1:200—1:2400 kann also bei den Blutkörperchen auch keine Hämolyse erwartet werden.

Es wurde nun untersucht, welches Bild die Zonen der irreversiblen Fällung und die der Hämolyse im Ultramikroskop geben.

Ultramikroskopische Untersuchung der irreversiblen Fällungszone.

Untersucht man Blutkörperchen, die mit Sublimat innerhalb der irreversiblen Fällungszone also von $HgCl_2$ 1:200 — $HgCl_2$ 1:2400 behandelt sind, so beobachtet man, daß die Blutscheiben

im Innern hellglänzende Strukturen (Körnungen) aufweisen (s. Abb. 1). Dies kann nur so gedeutet werden, daß $HgCl_2$ ins Innere eingedrungen ist und die Innensubstanz koaguliert hat. Für diese Koagulation kommen nur eiweißartige Bestandteile, also vor allem Hämoglobin in Betracht, keineswegs aber Lipoide, da nach den Untersuchungen von Porges und Neubauer[1]), wie wir bestätigen konnten, Lecithin oder Cholesterinsuspensionen durch $HgCl_2$ nicht ausgeflockt werden. Die so behandelten Blutkörperchen sind in Wasser nicht mehr löslich, die einzelnen

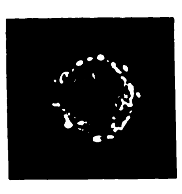


Abb. 1.



Abb. 2.



Abb. 3.

Strukturen quellen dabei höchstens und deformieren die blutscheibenhafte Anordnung (s. Abb. 2); manchmal auch kommt es zur Ausbildung beliebig geformter Haufen.

Der Einwand, daß die sichtbaren Strukturen nicht im Innern der Scheiben ausgebildet seien, wird durch noch zu besprechende Versuche in niederen $HgCl_2$-Konzentrationen entkräftet. In derselben Zone findet man seltener noch strukturierte Blutscheiben mit traubenförmigen Anhängseln (s. Abb. 3). Es handelt sich hier vermutlich entweder um primär ausgetretene Substanz, die im Moment des Austrittes in der $HgCl_2$haltigen Außenflüssigkeit koaguliert, oder um sekundären Austritt bereits im Innern koagulierter Substanz, der durch die besonders bei Wasserzusatz erfolgende Quellung ermöglicht wird.

Die hämolytische Zone.

a) Erscheinungen an der Oberfläche.

Geht man zur Untersuchung der hämolytischen Zone des Sublimats über, so findet man wesentlich andere Erscheinungen. Schon in der irreversiblen Fällungszone beobachtet man an der Oberfläche vereinzelter Scheiben schlauchförmige, unbewegliche Gebilde. In der hämolytischen Zone sind sie jedoch fast

[1]) Diese Zeitschr. 7, 1908.

regelmäßig, in den niederen Konzentrationen besonders deutlich vorhanden. Neben diesen findet man auch Gebilde von kugelförmigem Aussehen. Beide erreichen oft eine weit über den Blutkörperchendurchmesser hinausgehende Größe. (Abb. 4, 5, 6.) Diese schlauchförmigen und blasigen Austreibungen haben außerordentliche Ähnlichkeit mit dem sog. osmotischen Tang, den man erhält, wenn man z. B. Krystalle von $CuSO_4$ in eine Lösung von Blutlaugensalz wirft. Auch die Myelinformen, die beim Quellen von Lecithin in Wasser entstehen, erinnern sehr an diese Gebilde. Wir haben bereits ausgeführt, daß osmotische Wirkungen bei



Abb. 4.

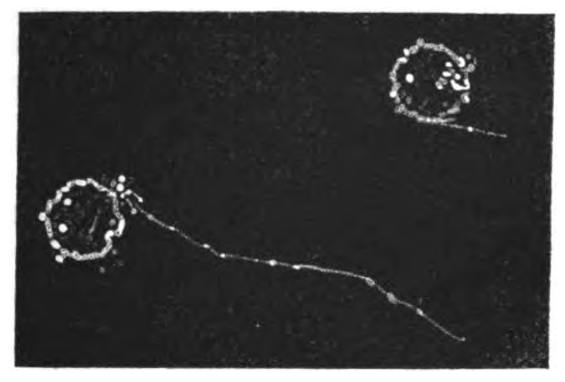


Abb. 5.

unseren Versuchen nicht in Betracht kommen. Deshalb scheiden in diesem Falle Analogieschlüsse im Zusammenhang mit dem osmotischen Tang von vornherein aus. Evtl. kämen also Quellungserscheinungen in Betracht. Vergleichende Untersuchungen in hypertonischen Lösungen, auf die wir, um nicht vorzugreifen, verweisen, ließen uns zu der Überzeugung kommen, daß die schlauchförmigen und blasigen Austreibungen rein mechanisch durch den Austritt von Flüssigkeit — Hämoglobinlösung bei der Hämolyse oder Wasser unter gewissen Bedingungen bei osmotischem Wasserentzug — durch eine zähplastische, in ihrer Konsistenz schmierige Masse hindurch, zu erklären sind.



Abb. 6.

Untersucht man die Bestandteile der Blutkörperchen, die

Lipoide und Hämoglobin, daraufhin, ob sie für diesen Zustand in Betracht kommen, so findet man, daß nur die ersteren diesen Bedingungen genügen. Sie werden in ihrem Zustand, der beim Lecithin ein zähplastischer ist, nicht verändert. Hämoglobin scheidet aus, da es durch $HgCl_2$ in höheren Konzentrationen, wo diese Austreibungen zuweilen auch beobachtet werden, gefällt wird. Das weniger häufige Vorkommen in den höheren Konzentrationen ist eben darauf zurückzuführen, daß das Hämoglobin bereits innerhalb der Scheiben niedergeschlagen wird.

Die gleichen schlauch- und blasenförmigen Gebilde, wie sie durch die Einwirkung des $HgCl_2$ entstehen, können auch an alten Blutkörperchenaufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung, die bereits mehr oder weniger deutliche Hämolyse zeigen, beobachtet werden. Auch pathologische Blutkörperchen, einem perniziös Anämischen entnommen, zeigten neben anderen Erscheinungen diese Austreibungen.

In mittleren und niederen $HgCl_2$-Konzentrationen trifft man oft massenhaft Schwärme von feinsten Teilchen oder von freien, fadenförmigen Gebilden. Ihr Durchmesser liegt weit unter der mikroskopischen Sichtbarkeit, wohl kleiner als 0,1 μ. Wir haben festgestellt, daß sie von Blutkörperchen abgesprengt sind, denn ihre Entwicklung am Blutkörperchen konnte zeitlich verfolgt, das Absprengen von kleinsten Teilchen mit Sicherheit beobachtet werden. Auch die Annahme, daß die beschriebenen, freien, beweglichen kleinsten Teilchen submikroskopische Mikroorganismen seien, hat sich nicht als stichhaltig erwiesen, denn ihre Form ist zu unregelmäßig und zu wenig scharf umgrenzt. Die Färbungen mit Karbolfuchsin zeigten bei Sterilhaltung der Röhrchen keine Mikroorganismen. Die Beobachtung ihrer Entstehung und ihres Ergusses aus dem Blutkörperchen in die Außenflüssigkeit machen obigen Schluß zwingend.

b) Erscheinungen an der Innensubstanz.

Die Wirkung des $HgCl_2$ auf die Innensubstanz der Blutkörperchen unterscheidet sich in der hämolytischen Zone ebenfalls wesentlich von der irreversiblen Fällungszone. Während wir in dieser derbe unbewegliche Strukturen beobachten, finden wir in jener feinkörnige Abscheidungen, die, soweit es der Platz

und die gegenseitige Lage gestatten, zähbeweglich sind (vgl. Abb. 7).

In Bild 8 ist der Moment festgehalten, in dem diese feinen Gebilde die Blutscheibe verlassen. In den ersten Augenblicken ging dieser Vorgang explosionsartig vor sich. Gewöhnlich findet man diese Abscheidungen nur in den $HgCl_2$ Grenzkonzentrationen zwischen irreversibler Fällungs- und hämolytischer Zone. In den niederen $HgCl_2$ Konzentrationen sind sie nur sehr selten. In diesen tritt an die Stelle der Strukturen eine vollkommen neue Erscheinung. Etwa von der Konzentration $HgCl_2$ 1 : 32 000 ab zieht sich konzentrisch zur Oberfläche der Blutkörperchen ein helleuchtendes, blasenförmiges, geschmeidiges Gebilde vom Rande zurück, das während der Beobachtung zusehends kleiner wird, um am Schlusse die Größe





Abb. 7.



Abb. 8.

eines im Innern der Scheibe tanzenden Kügelchens zu erreichen[1]). Durch Aufteilung dieses Gebildes können dabei auch 2—4 lebhaft bewegliche Kügelchen entstehen (s. Abb. 5). Der Vorgang ist bei dieser Aufteilung der gleiche wie bei dem ungeteilten Gebilde. Zuerst zähbewegliche Tröpfchen schrumpfen bis auf die Größe der Kügelchen zusammen, um von einer bestimmten Größe ab in lebhafte Bewegung zu geraten. Ist die Kontraktion so weit fortgeschritten, dann erlischt das Blutkörperchen langsam. In dem zurückbleibenden matten Gebilde, den „Schatten", tanzen die Kügelchen noch lange Zeit. Daß dieser Vorgang im Innern der Blutkörperchen stattfindet, ersieht man aus dem konzentrischen Zurückweichen des Gebildes. Würde es sich um eine Erscheinung an der Oberfläche handeln, so wäre es nicht wahrscheinlich, daß sie konzentrisch zum Rande der Scheibe verliefe. Daß die beschriebenen Kügel-

[1]) Dieser Vorgang zeigt je nach der Blutart recht erhebliche Abweichungen; er spielt sich z. B. bei Menschenblutkörperchen, wie sich aus den Untersuchungen von Dr. Salén an unserem Institut ergibt, anders ab.

chen im Innern der Scheiben tanzen, erkennt man daran, daß sie sehr oft am inneren Rande der Scheibe abprallen. Wären es Erscheinungen an der Oberfläche, so müßten sich die Kügelchen, wenn sie am Äquator der Scheibe angelangt sind, als Auswölbungen abzeichnen, was nicht der Fall ist. Das Erlöschen der Scheiben geht ohne besondere Erscheinungen in der Umgebung derselben vor sich. In der hämolytischen Zone liegen eben Sublimatkonzentrationen vor, die das austretende Hämoglobin nicht fällen.

Diskussion der Beobachtungen.

Eine Untersuchung aller bis jetzt beschriebenen Vorgänge ließ uns zu folgenden Schlußfolgerungen kommen:

Sublimat ist in der Oberfläche der Scheiben löslich, denn es hat Gelegenheit, ins Innere der Scheiben vorzudringen. Dort ruft es je nach seiner Konzentration verschiedene Erscheinungen hervor. In den hohen Konzentrationen werden die eiweißartigen Bestandteile sofort an Ort und Stelle ausgefällt: grobe Strukturen; Gebiet der irreversiblen Fällungszone.

Den Übergang zur hämolytischen Zone bilden feinkörnige Ausflockungen mit geringer Brownscher Bewegung (Übergangszone).

In der eigentlichen hämolytischen Zone wirkt das $HgCl_2$ nicht mehr fällend auf die Innenbestandteile, sondern entquellend. Das beschriebene, sich zusammenziehende Gebilde gleicht einer Blase, die mit einem dünnen Oberflächenhäutchen versehen ist. Ob dieses Häutchen bereits vorgebildet ist, oder ob es sich unter der Einwirkung des $HgCl_2$ erst bildet, läßt sich auf Grund dieses Versuches nicht entscheiden.

Die Kontraktion einer solchen angenommenen inneren Blase ist nur möglich, wenn die Flüssigkeit herausgepreßt wird.

Das Produkt des Vorganges, das tanzende Kügelchen, ist sehr dicht oder besitzt einen besonders starken Brechungskoeffizienten, denn es leuchtet sehr hell auf und unterscheidet sich wesentlich von der Beleuchtung der Oberfläche. Daß es sich in einem flüssigen Medium befindet, beweist die lebhafte Bewegung desselben. Manchmal kommen die Kügelchen mit dem Erlöschen der Scheibe zur Ruhe und verschwinden scheinbar, in Wirklichkeit lagern sie sich, wie einzelne Beobachtungen ergaben, der Wandung der Scheibe an, so daß sie un-

sichtbar werden. Normalerweise bleiben sie jedoch dauernd in Bewegung.

Diese Erscheinungen zwingen, wie gesagt, zu dem Schluß, daß die eiweißartigen Bestandteile des Innern flüssig sind. Da das Verhältnis von H_2 O zu Hämoglobin nach Abderhalden wie 2: 1 ist, so muß die Lösung recht viscös sein.

Hämolysiert man reinen Blutkörperchenbrei mit einem Tropfen Arachnolysin oder 3—4 Tropfen Saponin, so erhält man zähflüssige, vollkommen durchsichtige Massen, die in ihrer Konsistenz zwischen einer zähen Lösung und einer dünnen, noch nicht formbeständigen Gallerte stehen.

Noch besteht eine gewisse Unstimmigkeit zwischen der sehr lebhaften Brownschen Bewegung der „tanzenden Kügelchen" und der Viscosität der Hämoglobinlösung; wir müßten denn das tanzende Kügelchen als sehr klein ansehen.

Die Erscheinung der Kontraktion der Blase erlaubt auch Schlüsse zu ziehen, ob bei den Blutkörperchen von einem inneren festen Gerüst gesprochen werden kann. Eine solche Annahme verträgt sich wenig mit der verhältnismäßig schnellen — der Vorgang spielt sich beispielsweise in $HgCl_2$ 1: 32 000 in 5—10 Min. ab — und vollkommen gleichmäßigen Kontraktion. Wäre das sich kontrahierende Gebilde Gerüst, so müßte es sich durch Ausbuchtungen usw. bemerkbar machen, denn es könnte sich vermutlich nicht so gleichmäßig kontrahieren, wie es das ganze Gebilde tut. Das Endprodukt der Kontraktion, das tanzende Kügelchen, wäre auch viel zu klein bei Annahme eines selbst sehr zarten Gerüstes.

Auf Grund unserer Beobachtungen haben wir uns von der Sublimathämolyse folgendes Bild gemacht: Die Hämolyse geht in 3 Stufen vor sich.

1. Auflösung des $HgCl_2$ in der Oberfläche.

2. Kontraktion einer entweder bereits vorgebildeten oder sich erst durch die Einwirkung des $HgCl_2$ bildenden Blase an der Innenseite der Membran. Gleichzeitig mehr oder weniger vollkommene Auspressung des flüssigen Inhalts einschließlich der Hämoglobinlösung.

3. Die durch die Kontraktion frei gewordenen flüssigen Bestandteile verlassen die Blutkörperchenscheibe durch die verletzte Oberfläche unter Schlauch- und Blasenbildung.



Über den Temperaturkoeffizienten der H_2O_2-Spaltung durch Fettkatalase.

Von

E. Nordefeldt.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 24. Juni 1920.)

Bei einigen Enzymen sind chemische Unterschiede je nach der Herkunft mit Sicherheit nachgewiesen, z. B. bei Lipasen, Amylasen und (hinsichtlich der Temperaturstabilität) bei Saccharasen.

Bei der Katalase glaubt O. Loew[1]) zwei verschiedene Arten, α-Katalase und β-Katalase, gefunden zu haben. Andererseits scheinen mehrere in den Arbeiten von Waentig und Steche[2]) angegebene physikalisch-chemische Tatsachen dafür zu sprechen, daß die Katalasen verschiedenen Ursprunges identisch sind.

Auf Prof. Eulers Anregung habe ich den Temperaturkoeffizienten der Fettkatalase bestimmt, um zu untersuchen, ob in dieser Hinsicht eine Verschiedenheit gegenüber Blutkatalase aufzuweisen wäre.

Theoretisches.

Senter[3]) betont, daß die Reaktion $2\,H_2O_2$ + Katalase $\rightleftarrows$ $2\,H_2O + O_2$ + Katalase in großer Verdünnung eine Reaktion erster Ordnung sei. Waentig und Steche sind zum Resultate gekommen, daß die Reaktion nicht genau eine solche erster Ordnung sei, sich aber in großer Verdünnung einer solchen ziemlich nähere.

Wenn die Reaktion erster Ordnung ist, muß die katalytische Wasserstoffperoxydzersetzung folgenden Bedingungen genügen:

$$\frac{dC}{dt} = k' \cdot C_t,$$

---

[1]) U. S. Department of Agriculture. Report No. 68. 1901.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 226. 1911; **76**, 177. 1911; **79**, 446. 1912; **83**, 315. 1913.

[3]) Zeitschr. f. physik. Chem. **44**, 257. 1903.

wo C_t die Konzentration zur Zeit t und k' die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bedeuten. Durch Integration erhält man hieraus

$$k' = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{C_{t1}}{C_{t2}} \quad \text{oder} \quad 4343\, k' = k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{C_{t1}}{C_{t2}}. \qquad (1)$$

Formeln für die Beziehung zwischen Geschwindigkeitskonstante und Temperatur bei einer chemischen Umsetzung haben van 'tHoff und Arrhenius aus theoretischen Gründen hergeleitet. Die Arrheniussche Formel lautet:

$$k_2 = k_1 \cdot e^{\frac{A(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}}, \qquad (2)$$

wo A den Temperaturkoeffizient bedeutet, R die Gaskonstante, k_1 und k_2 die den absoluten Temperaturen T_1 und T_2 zugehörigen Geschwindigkeitskoeffizienten und e die Basis des natürlichen Logarithmensystems.

Mit Benutzung der Formel (1) habe ich die Werte von k_1 und k_2 bestimmt, wonach A aus Formel (2) berechnet wurde.

Die störende Einwirkung der organischen Substanz beim Titrieren kann vernachlässigt werden, da eine stark verdünnte Kaliumpermanganatlösung die organischen Bestandteile der Katalase bei niedriger Temperatur fast gar nicht oxydiert. Weil also die verbrauchte Permanganatlösung dem unzersetzten Wasserstoffsuperoxyd proportional ist, können ihre Volumina bei zwei Ablesungen mit dem Zeitintervall $t_2 - t_1$ Minuten in Formel (1) als Zähler und Nenner eingesetzt werden, wodurch k für diese Temperatur erhalten wird.

Wenn $R = 2$ gesetzt wird, findet man durch Transformierung der Formel (2):

$$A = \frac{\log\left(\frac{k_2}{k_1}\right) \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot 2}{0{,}4343\,(T_2 - T_1)},$$

woraus in den folgenden Tabellen A berechnet ist.

Experimentelles.

Die Katalase wurde aus frischem, geschabtem und zerschnittenem Schweinsnierenfett hergestellt. Dieses wurde mit dem gleichen Gewicht lauwarmen Wassers und etwas Seesand durchgeknetet, wonach das Gemisch drei Stunden bei 30° sich selbst überlassen wurde. Nach dem Erkalten wurde das Extrakt

abgegossen, auf 0° abgekühlt und filtriert und mit einem Gemisch aus 5 Volumina 96 proz. Alkohol und 1 Volumen Äther gefällt. Nach dem Absetzen wurde der bräunliche Niederschlag im Büchnertrichter gesammelt, mit einem Gemisch aus absolutem Alkohol und etwas Äther ausgewaschen und im Vakuumexsiccator über festem Kaliumhydroxyd getrocknet. Hiervon wurde zu jedem Versuch eine abgewogene Menge Katalase mit einem Liter destillierten Wassers beigesetzt und geschüttelt und nach stundenlangem Stehen filtriert.

Der Wasserstoffperoxyd (Mercks Perhydrol) wurde mit destilliertem Wasser zur Konzentration $^{n}/_{50}$ versetzt.

Nachdem die beiden Lösungen im Thermostaten die gewünschte Temperatur angenommen hatten, wurden sie darin miteinander gemischt und der Gang der Katalyse dadurch verfolgt, daß von Zeit zu Zeit Proben mit einer Pipette aufgenommen und nach Versetzen mit Schwefelsäure, mit Kaliumpermanganatlösung titriert wurden.

Die Mischungen von Katalaselösung und Wasserstoffperoxyd zeigten sich beim Prüfen mit p-Nitrophenol, Phenolphthalein und Lackmus neutral.

Resultate.

Die Resultate der Versuche sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt.

Versuch 1. Katalaselösung = 0,2 g Katalase im Liter.
H_2O_2-Lösung = $^{n}/_{50}$.
$KMnO_4$-Lösung = $^{n}/_{50}$.

1 Vol. Katalaselösung + 1 Vol. H_2O_2-Lösung in Mischung.

a) Temp. 0°.

Zeit (Minuten)	0	40	50	60	70	80	
Mischung (ccm)	50	50	50	50	50	50	
$KMnO_4$ (ccm)	35,4	9,5	7,1	5,4	4,1	3,0	
k (berechnet)		143	140	136	134	134	Mittel $k = 137$.

b) Temp. 19°.

Zeit	0	20	30	
Mischung	50	50	50	
$KMnO_4$	24,3	6,8	3,6	
k		277	276	Mittel $k = 276$.

Hiervon berechnet $A = 6037$.

Versuch 2. Katalase = 0,2 g im Liter.
H_2O_2 = $^{n}/_{50}$.
$KMnO_4$ = $^{n}/_{200}$.

1 Vol. Katalase + 1 Vol. H_2O_2.

a) Temp. 0°.

Zeit	0	18	28	38	50	58	78	88	
Mischung	20	20	20	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	60,0	53,8	49,2	46,2	44,0	41,9	37,6	36,6	
k		26	31	30	27	27	26	24	Mittel $k = 27$.

b) Temp. 16,5°.

Zeit	0	13	23	33	43	53	63	68	73	83	88	98
Mischung	50	50	50	50	50	50	20	20	20	20	20	20
$KMnO_4$	148,0	123,0	107,8	96,0	86,0	78,0	29,3	28,0	26,9	24,9	23,9	22,1
k		62	60	57	55	53	49	48	47	45	45	43

Mittel $k = 51$. Hiervon berechnet $A = 6093$.

Versuch 3. Katalase = 0,1 g im Liter.
$H_2O_2 = {}^n/_{50}$.
$KMnO_4 = {}^n/_{100}$.
1 Vol. Katalase + 1 Vol. H_2O_2.

a) Temp. 0°.

Zeit	0	10	20	31	46	
Mischung	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	17,45	14,05	11,4	9,2	7,5	
k		94	92	90	80	Mittel $k = 89$.

b) Temp. 17°.

Zeit	0	8	28	38	
Mischung	20	20	20	20	
$KMnO_4$	19,6	14,1	6,4	4,4	
k		179	174	171	Mittel $k = 175$.

Hiervon berechnet $A = 6155$.

Versuch 4. Katalase = 0,1 g im Liter.
$H_2O_2 = {}^n/_{50}$.
$KMnO_4 = {}^n/_{100}$.
1 Vol. Katalase + 1 Vol. H_2O_2.

a) Temp. 0,5°.

Zeit	0	10	20	30	40	
Mischung	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	18,85	17,4	15,9	14,7	13,6	
k		35	37	36	35	Mittel $k = 36$.

b) Temp. 17°.

Zeit	0	10	20	30	40	
Mischung	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	17,50	14,70	12,65	11,15	9,87	
k		76	70	65	62	Mittel $k = 68$.

Hiervon berechnet $A = 6114$.

Versuch 5. Katalase = 0,1 g im Liter.
$H_2O_2 = {}^n/_{50}$.
$KMnO_4 = {}^n/_{100}$.
1 Vol. Katalase + 1 Vol. H_2O_2.

a) Temp. 0°.

Zeit	0	10	20	30	40	
Mischung	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	15,12	11,62	9,05	7,02	5,87	
k		114	112	111	103	Mittel k = 110

b) Temp. 16,2°.

Zeit	0	10	20	30	40	
Mischung	20	20	20	20	20	
$KMnO_4$	12,20	7,48	4,55	2,98	2,00	
k		212	214	204	196	Mittel k = 207.

Hiervon berechnet $A = 6146$.

Mittel dieser fünf Werte: $A = 6100 \pm 100$.

Zusammenfassung.

Für die H_2O_2-Spaltung durch Fettkatalase wurde die Konstante A der Arrheniusschen Temperaturformel bestimmt. Hierbei wurde für das Intervall 0°—19° der Wert $A = 6100 \pm 100$ gefunden, während sich aus Senters mit Blutkatalase ermittelten Zahlen ca. 6200 ergibt.

Die kleine Verschiedenheit läßt sich durch Versuchsfehler und methodische Ungleichheiten erklären. Ein Unterschied zwischen beiden Katalasen ließ sich also in dieser Hinsicht nicht nachweisen.

Über die Bestimmungen des Blutkörperchenvolumens.

Von

Rich. Ege.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 27. Juni 1920.)

Bei Untersuchungen über die Stoffverteilung zwischen dem Plasma und den roten Blutkörperchen stößt man auf die Schwierigkeit, daß es nur selten gelingt, mit einer durchaus plasmafreien Blutkörperchenmasse zu arbeiten; sei es, daß man das Gesamtblut und das Plasma oder eine mehr oder minder dicht abzentrifugierte Blutkörperchenaufschlemmung und das Plasma analysiert, um daraus zu berechnen, in welcher Konzentration der gesuchte Stoff in den Blutkörperchen vorhanden ist, so muß man daher das absolute Volumen der Blutkörperchen kennen.

Es gibt nun eine Reihe Methoden zur Bestimmung des Gesamtvolumens der Blutkörperchen: diese Methoden habe ich durchgeprüft und unter sich verglichen.

Die untersuchten Methoden waren folgende:

1. Die Leitungsvermögen-Methode (Berechnung des Blutkörperchenvolumens durch Vergleichung zwischen dem Leitungsvermögen des Plasmas und des Gesamtblutes).
2. Bleibtreus Methode.
3. Stewarts colorimetrische Methode.
4. Die Hämatokrit-Methode.

Was für meine Untersuchungen besonders Interesse hatte, war, mittels einer Methode, die einen absoluten Wert des Blutkörperchenvolumens ergab, zu untersuchen, wie groß der bei der Zentrifugiermethode vorliegende Fehler unter bestimmten Verhältnissen sei, um dann diese Bestimmung als Korrektur der Zentrifugierbestimmungen zu benutzen[1]).

[1]) Praktisch gesprochen sind alle, welche die Zentrifugierung zur Bestimmung des Blutkörperchenvolumens benutzt haben, darüber einig,

Ich werde indessen diese Versuche nur so kurz wie möglich besprechen, indem eine nähere Durchnahme der Literatur gezeigt hat, daß die Zentrifugierungsmethode unter bestimmten Verhältnissen Werte des tatsächlichen Blutkörperchenvolumens ergeben müsse. Ich denke hier an Koeppes Beobachtung des Übergangs der Blutkörperchen von Deckfarbe zu Lackfarbe bei hinreichend schneller (und langwieriger) Zentrifugierung[1]). Diese Erscheinung betrachtet Koeppe als einen Beweis davon, daß die einzelnen Blutkörperchen nebeneinanderliegen ohne die geringste Spur von Plasma dazwischen, was noch durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt wurde, durch die es sich zeigte, daß die Blutkörperchen regelmäßig sechseckig waren.

Diese Deutung ist ganz unzweifelhaft richtig; wenn ich nichtsdestoweniger die Versuche bespreche, die ich angestellt habe, und die eben das Resultat ergaben, daß eine Hämotokritbestimmung das tatsächliche Blutkörperchenvolumen ergeben konnte, so steht das u. a. mit dem Umstand in Verbindung, daß Gryns die Richtigkeit von Koeppes Schlußfolgerung bestreitet[2]).

1. Die Bestimmung bei der Leitungsvermögensmessung beruht auf der von Roth[3]), Bugarszky und Tangel[4]) sowie von Stewart[5]) festgestellten Tatsache, daß das Plasma den elektrischen Strom gut, die Blutkörperchen denselben aber sehr schlecht leiten; infolgedessen wird das Gesamtblut schlechter leiten als das Plasma und um so viel schlechter, je mehr Blutkörperchen vorhanden sind.

Auf rein empirischem Wege haben Bugarszky und Tangl sowie Stewart eine Formel aufgestellt, nach der das Blutkörper-

---

daß die Methode nicht den absoluten Wert des Blutkörperchenvolumens ergibt. Wieviel Plasma aber annehmbar noch zwischen den Blutkörperchen vorhanden ist, wird recht verschieden angegeben. Kozawa veranschlagt rein mutmaßlich die Plasmamenge, die nach einer Zentrifugierung bis auf das konstante Volumen noch unter den Blutkörperchen vorhanden ist, zu 10%. — Siehe gleichfalls Hedin, Skand. Archiv V. 1895 und Fränckel, Zeitschr. f. klin. Med. 52, 1904.

1) Pflügers Archiv 107. 1905.

2) Pflügers Archiv 109. 1905.

3) Zentralbl. f. Physiol. 11. 1897.

4) Zentralbl. f. Physiol. 11. 1897.

5) Journ. of Physiology 24. 1899.

volumen sich aus Leitungsvermögensmessungen in Plasma und Gesamtblut berechnen läßt. Oker Blom[1]) hat eine wesentliche theoretische Stütze für diese Methode geliefert durch seine Untersuchungen über das Leitungsvermögen von Salzlösungen, in welche Sandkörner suspendiert waren, indem er fand, daß die Herabsetzung des Leitungsvermögens nur eine Funktion des gesamten Volumens der Sandkörner sei, während sie von der Größe der Sandkörner (innerhalb recht weiter Grenzen) unabhängig war. Oker Blom und Fränckel[2]) haben Kurven angegeben, mittels derer man aus dem Verhältnis zwischen dem Leitungsvermögen des Serums und des Blutes das Blutkörperchenvolumen ablesen kann.

Nach Oker Bloms Untersuchungen ist man geneigt, anzunehmen, daß die gegebene Kurve auf verschiedene Blutsorten müßte angewendet werden können; man muß sich indessen erinnern, daß die Blutkörperchen nicht mit indifferenten Sandkörnern parallelisiert werden können; die Frage von der Permeabilität der Blutkörperchen gegenüber Ionen ist noch immer ein sehr strittiges Problem; es ist aber nicht zu bezweifeln, daß die Blutkörperchen gegenüber gewissen Ionen permeabel sind; ändert sich diese Permeabilität, so ist es möglich, daß dieselbe Kurve sich nicht einmal gegenüber derselben Blutsorte benutzen läßt.

Wie dem nun auch sei, so wiesen meine Versuche eine einigermaßen gute Übereinstimmung auf zwischen dem durch die Hämatokritmethode gefundenen und dem mittels der Fränckelschen Kurve aus dem Leitungsvermögen berechneten Blutkörperchenvolumen auf, solange mit defibriniertem Blut gearbeitet wurde; dagegen ergaben sich recht grobe Differenzen, wenn ich Fluornatrium- oder Oxalatblut benutzte. Solange die Methode noch nicht weiter durchprüft worden ist, glaube ich daher nicht, daß es geraten ist, sie bei allen Blutsorten zu benutzen; da die Methode zudem weder besonders leicht, noch genau ist, wird sie kaum eine größere Rolle spielen.

2. Bleibtreus Methode[3]): Eine bekannte Blutmenge wird mit einer bekannten Menge isotonischer Salzlösung verdünnt; wird der Stickstoffgehalt des ursprünglichen Plasmas

---

[1]) Pflügers Archiv 79. 510. 1900.

[2]) Fränckel, Zeitschr. f. klin. Med. 52. 1904.

[3]) Pflügers Arch. 51. 1892.

und des Salzplasmas bestimmt, so kann man das Blutkörperchenvolumen aus einer einfachen Gleichung berechnen. Bei zwei verschiedenen Verdünnungen erhält man 3 Gleichungen zur Bestimmung des Blutkörperchenvolumens. Die Bestimmungen müssen natürlicherweise unter sich übereinstimmen; von der Kontrolle abgesehen, die man in der Weise erhält, habe ich die Methode durch Vergleichung mit Hämatokritbestimmungen kontrolliert.

Über die Bleibtreusche Methode besitzen wir eine ganze Literatur[1]). Die meisten von den Einwänden, die gegen die Methode erhoben worden sind, beruhen auf dem Umstand, daß Bleibtreu als Verdünnungsflüssigkeit eine 0,6 proz. NaCl-Lösung anwandte, und daß die Methode in dem Falle irrtümliche Werte ergeben muß, ist einleuchtend; dagegen mußte man von vornherein geneigt sein, anzunehmen, daß die Methode bei einer Verdünnung mit einer isotonischen Lösung korrekt sei. Der einzige Einwand, den man sofort gegen die Methode erheben kann, ist, daß die Blutkörperchen stickstoffhaltige Krystalloide (z. B. Harnstoff) enthalten, die ausdiffundieren können und werden, sobald das Plasma mit der Salzlösung verdünnt wird; es handelt sich jedoch um so kleine Mengen, daß es kaum zu ernsthaften Fehlern führen wird.

Hedin[2]) und Scott[3]) haben Verhältnisse beobachtet, die, falls sie richtig sind, durchaus die Unbrauchbarkeit der Methode beweisen. Da die von Hedin und Scott gefundenen Verhältnisse miteinander direkt in Widerspruch sind, muß man sich ihren Versuchen gegenüber gewiß recht skeptisch verhalten.

Hedin findet, daß fast der gesamte Proteinstoff bei Verdünnung mit 2—3 Vol. 0,9 proz. NaCl vom Plasma verschwinden kann und schreibt daher: „Ich halte es somit für sichergestellt, daß die Blutkörperchen unter gewissen Bedingungen Stickstoff aus den serösen Flüssigkeiten aufnehmen. Die Wanderungen der Eiweißkörper beruhen auf Verhältnissen, die wir vorläufig nicht kennen.“

---

[1]) Für die Methode: Lange, Pflügers Arch. 52, Wendelstadt u. Bleibtreu, Pflügers Arch. 52, Bleibtreu, Pflügers Arch. 54. — Gegen die Methode: Hamburger, Zeitschr. f. Physiol. 1893; Eykman, Pflügers Arch. 60, 1895; Biernachi, Zeitschr. f. phys. Chemie 19. 1894; Hedin, Pflügers Arch. 60. 1895.

[2]) Pflügers Arch. 60.

[3]) Scott, Journ. of Physiol. 50. 1915–16.

In Übereinstimmung damit findet Hedin, daß Bleibtreus Methode unzuverlässige Werte des Blutkörperchenvolumens ergibt.

Scott kommt zu demselben Resultat, seine Versuche besagen aber, daß, je nachdem das Blut mit 0,9 proz. NaCl verdünnt wird, sowohl Protein-Stickstoff als Nichtprotein-Stickstoff aus den Blutkörperchen in die Salzlösung diffundieren. Beide behaupten daher, daß der Proteinstoff durch das Blutkörperchenhäutchen diffundieren können, muß eine Behauptung, die allerdings von Hamburger und Stewart unterstützt wird, im übrigen aber der allgemeinen Auffassung von der Natur des Blutkörperchenhäutchens widerspricht.

Die Untersuchungen, die ich über die Bleibtreusche Methode angestellt habe, überzeugten mich schnell davon, daß die Methode unbrauchbar sei.

Die Werte, welche man findet, je nachdem man das eine oder das andere Verdünnungsverhältnis benutzt, differieren oft ganz außerordentlich viel, wie diese Werte sich oft sehr von dem wahren Blutkörperchenvolumen unterscheiden (siehe unten).

Die wesentlichsten Fehlerquellen sind meiner Meinung nach folgende:

1. Ausdiffundieren von stickstoffhaltigen Krystalloiden während der Verdünnung.

2. Die Verdünnungsflüssigkeit wirkt abändernd auf das Blutkörperchenvolumen; so bewirkt eine 0,9 proz. NaCl-Lösung, wie in einem späteren Aufsatz gezeigt werden soll, ein Anschwellen der Blutkörperchen.

3. Die Formel, nach der das Blutkörperchenvolumen sich berechnen läßt, ist von einer solchen Beschaffenheit, daß auch ganz kleine Fehler der Stickstoffbestimmungen einen sehr großen Einfluß auf das Resultat ausüben können.

3. Schließlich führe ich einige Versuche an, in denen ein Vergleich angestellt wurde zwischen einer von Stewart angegebenen colorimetrischen Methode und der Hämatokritmethode.

Stewarts Methode: Eine bekannte Menge Blut wird zentrifugiert; das blutkörperchenfreie Plasma wird so genau wie möglich abpipettiert; darin wird etwas Hämoglobin gelöst; eine bekannte Menge der gefärbten Lösung wird zu dem übriggebliebenen Blutkörperchenbrei gesetzt, dessen Volumen bekannt

ist. Die Mischung wird wieder zentrifugiert und das gefärbte Plasma abpipettiert, durch Vergleich zwischen der Farbenstärke des zugesetzten und abpipettierten Plasmas berechnet man, wieviel Plasma noch in dem Blutkörperchenbrei vorhanden war. Gegen diese Methode läßt sich kaum ein Einwand erheben — wenn man nur die Zeit von dem Zusatze des gefärbten Plasmas bis zu dessen Abpipettierung hinreichend kurz sein läßt, so daß keine spontane Hämolyse stattfinden kann; der gefundene Wert muß daher das wahre Blutkörperchenvolumen darstellen, was Stewart noch durch einen Vergleich zwischen dieser Methode und Hoppe-Seylers Fibrinogenmethode nachgewiesen hat.

Die Methode ist jedoch recht schwer und nicht anwendbar, wenn man nicht recht große Blutmengen zur Verfügung hat; ich habe daher die Methode nicht in den eigentlichen Versuchen benutzt, sondern sie nur angewandt, um zu untersuchen, ob die Hämatokritmethode Werte ergebe, denen systematische Fehler anhaften, wie dies im allgemeinen angenommen wird, und um in dem Falle festzustellen, wie groß dieser Fehler ist.

Es widersprach daher meinem Erwarten, daß die Versuche zu dem Resultat führten, daß zwischen den Hämatokritbestimmungen und den bei Anwendung der Stewartschen Methode gefundenen Werten kein systematischer Unterschied bestand.

Setzen wir den Hämatokritwert = 100, so erhalten wir folgende mittlere Zahlen der Stewartschen Methode (Durchschnitt von 5 Bestimmungen)

$$100{,}2 + 1{,}17.$$

In den obenerwähnten Versuchen wurde bis auf absolutes konstantes Volumen zentrifugiert, was mit einzelnen Blutproben in 1—$1^1/_2$ Stunden, mit anderen dagegen erst nach 4—6 Stunden erzielt wurde[1]).

[1]) Bugarszky und Tangl finden, daß das Leitungsvermögen in einer Blutkörperchenaufschwemmung vermindert wird, je länger zentrifugiert wird, bis man zu einem konstanten Wert kommt, in der Regel nach etwa 6 Stunden, in einzelnen Versuchen erst nach 48 Stunden. Dies ist ein Beweis davon, daß es mindestens 48 Stunden dauern kann, bevor das Plasma vollständig verdrängt worden ist. Der Versuch läßt sich jedoch, wie aus dem folgenden hervorgehen wird, nicht direkt mit den obengenannten Bestimmungen vergleichen, da die Zeit, welche zum quantitativen Herabzentrifugieren der Blutkörperchen verbraucht wird, von der Größe der Probe abhängig ist.

Das Zentrifugieren fand statt in dünnen Hämatokritröhren. Ein sicheres Anzeichen dafür, daß die Blutkörperchen soweit wie möglich hinabzentrifugiert worden sind, hat man an der Veränderung, die in dem Falle mit der Blutkörperchensäule stattfindet. Das Zentrifugieren ist fertig, wenn die Blutkörperchensäule durchsichtig geworden ist, wovon man sich am leichtesten überzeugt, indem man untersucht, ob es möglich ist, die Einteilungen und Zahlen der Hämatokritröhre durch die Blutkörperchensäule zu sehen.

Der theoretischen Bedeutung dieser Erscheinung hatte ich keine Aufmerksamkeit gewidmet, bevor ich Koeppes Abhandlung las; daß er recht hat, wenn er behauptet, daß der Übergang von Deckfarbe zu Lackfarbe bedeuten muß, daß die gesamte Flüssigkeit, die zwischen den Blutkörperchen vorhanden war, herausgepreßt sein muß, und daß eine solche Hämatokritbestimmung daher das wahre Volumen der Blutkörperchen ergeben muß — darüber hege ich keinen Zweifel. Einen Beweis dafür hat man an der obengenannten Übereinstimmung mit der Stewartschen Methode.

Dagegen ist er weniger erfolgreich in der Erörterung, ob es möglich ist, daß der gefundene Wert des Blutkörperchenvolumens zu klein sein kann wegen des hydrostatischen Überdruckes, der während der Zentrifugierung in den Zentrifugengläsern entsteht. Koeppe kommt zu dem Resultat, daß der Druck, der auf der Blutkörperchensäule ruht, kleiner ist als der osmotische Druck der Blutkörperchen; es wird daher kein Wasser aus dem Blutkörperchen herausgepreßt werden können. Dazu macht Gryns die vollständige korrekte Bemerkung, daß der osmotische Druck inner- und außerhalb der Blutkörperchen derselbe ist, und behauptet daher, daß der geringste hydrostatische Überdruck genügen wird, um Wasser aus den Blutkörperchen herauszupressen; wenn er aber daraus schließt, daß das Zentrifugieren zur Folge haben wird, daß das Wasser in derselben Weise aus den Blutkörperchen herausgepreßt wird, wie man aus einem Schwamm Wasser herauspressen kann, so ist dies nicht richtig. Es ist nämlich nicht nur der osmotische Druck, der innerhalb und außerhalb der Blutkörperchen der gleiche ist; dasselbe gilt natürlicherweise von dem hydrostatischen Druck. Es ist daher nicht zu befürchten, daß das Zentrifugieren so kräftig und langwierig

sein kann, daß die Blutkörperchen aus dem Grunde bis auf ein kleineres Volumen zusammengedrückt werden können, als sie normaliter einnehmen. Dieses theoretische Räsonnement wird, wie gesagt, durch meine Versuche unterstützt.

Man muß gleichfalls erwarten, daß die Blutkörperchen, ohne entzweizugehen, ein so kräftiges Zentrifugieren ertragen können. Der einzige schwache Punkt liegt in dem verschiedenen spezifischen Gewicht der verschiedenen Bestandteile des Blutkörperchens (Stroma kontra Inhalt). Besteht ein Unterschied im spezifischen Gewicht, so wird das Zentrifugieren die Bestandteile ihren spezifischen Gewichten gemäß voneinander zu trennen suchen. Da es indessen nach Koeppe[1]) auch bei sehr langwierigem und schnellem Zentrifugieren nicht möglich ist, die „Blutkörperchenschatten" herabzuzentrifugieren, scheint eine solche Annahme hinfällig zu sein. Es ist daher kaum zu bezweifeln, daß die Hämatokritmethode das wahre Blutkörperchenvolumen angibt, wenn das Zentrifugieren fortgesetzt wird, bis die Blutkörperchensäule — in ihrer gesamten Länge — deutlich durchsichtbar wird. Dies läßt sich in einer ganz gewöhnlichen Zentrifuge erzielen, wenn es auch oft eine sehr lange Zentrifugierzeit erfordert. Die oben angeführten Betrachtungen scheinen nur zuzutreffen, solange das Zentrifugieren in Capillarröhren stattfindet. Beim Zentrifugieren von großen Blutproben ist es merkwürdigerweise bedeutend schwerer, die Blutkörperchen herabzuzentrifugieren. Die Blutkörperchenmasse, die ich bei sehr langwierigen Zentrifugieren (3—5 Stunden) mit einer langsam laufenden Zentrifuge (2000—3000 Umdrehungen pro Minute) in großen Röhren gewann, enthielt bei der Hämatokritbestimmung 10% Plasma oder mehr.

Resumé.

Die Hämatokritmethode stellt ein leichtes und genaues Mittel zur Bestimmung des wahren Blutkörperchenvolumens dar.

[1]) Über das Lackfarbenwerden etc. II. Die semipermeable Wand. Pflügers Arch. 107. 1905.

Beiträge zur Technik der Milchsäurebestimmung und der Ermittlung des maximalen Milchsäurebildungsvermögens von Muskeln.

Von

Genia Riesenfeld.

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener physiologischen Universitäts-Instituts.)

(Eingegangen am 20. Juni 1920.)

I. Fragestellung.

Durch neuere Forschungen auf dem Gebiete der Physiologie ist nicht allein die Milchsäure in das Zentrum jener Probleme gerückt worden, welche die Kontraktions- und Starrephänomene des Muskels betreffen; dieselbe hat vielmehr auch vom Standpunkte der Stoffwechsellehre und der Gärungschemie aus ein erhöhtes Interesse für sich in Anspruch genommen, insbesondere für alle jene Fragen, welche den Kohlehydratabbau betreffen. Es erscheint nachgewiesen, daß, wenn auch nicht der Hauptweg, so doch sicherlich einer der Nebenwege des Kohlehydratabbaus im Organismus über die Milchsäure gehe.

Die Erforschung der physiologischen Bedeutung der Milchsäure und aller damit im Zusammenhange stehenden Probleme ist insbesondere durch den Umstand sehr behindert worden, daß es lange Zeit hindurch an einem geeigneten Verfahren gemangelt hat, die Milchsäure in exakter Weise quantitativ bestimmen zu können. Diese Schwierigkeit erscheint durch das Aldehydverfahren von O. Fürth und Charnass[1]) (Oxydation der Milchsäure in heißer, schwefelsaurer Lösung durch Eintropfen

[1]) Diese Zeitschr. 26, 199. 1910. Vgl. die Literatur bei O. Fürth, Probleme der physiologischen und pathologischen Chemie II. S. 443—446. 1913. Vgl. ferner: H. Ishihara (Physiol. Inst. Wien), Diese Zeitschr. 50, 468. 1913, und O. Fürth, Diese Zeitschr. 69, 199. 1915.

von Permanganatlösung, jodometrische Bestimmung des abdestillierten Aldehyds durch Bisulfitaddition) und durch die Ausgestaltung des Bestimmungsverfahrens im Fürthschen Laboratorium einerseits, im Embdenschen Institute[1]) in Frankfurt andererseits im wesentlichen beseitigt. Immerhin sind aber in bezug auf die Technik der Milchsäurebestimmung noch zahlreiche Fragen offen und zahlreiche Schwierigkeiten unbehoben geblieben. Die nachfolgende Arbeit ist auf Veranlassung von Professor Fürth in der Absicht in Angriff genommen worden, wenigstens in einigen Richtungen eine diesbezügliche Klärung herbeizuführen.

1. Eine Schwierigkeit betrifft zunächst die vollständige Extraktion der Milchsäure aus wässeriger Lösung. Aus den Beobachtungen des Embdenschen Laboratoriums geht hervor, daß es einer 24—48stündigen Extraktion mittels des rotierenden Lindtschen Apparates (der einen Wirbel feinster Ätherbläschen durch die Flüssigkeit treibt) bedarf, um die Milchsäure vollständig zu extrahieren. Dieses Verfahren läßt sicherlich an Exaktheit nichts zu wünschen übrig, doch ist es höchst zeitraubend und umständlich; auch steht der Lindtsche Apparat nebst dem zu seinem Betriebe erforderlichen Motor ja nicht in jedem Laboratorium zur Verfügung.

Ein neues Verfahren von Ohlson[2]) schien daher einen wesentlichen Fortschritt zu bedeuten. Derselbe wendet den Amylalkohol statt des Äthers als Extraktionsmittel an. Der Teilungskoeffizient der in Wasser gelösten Milchsäure für Äther ist ein recht ungünstiger (0,1 für Wasser, 0,3 für gesättigte Ammonsulfatlösung). Wesentlich günstiger ist der Teilungskoeffizient zwischen Amylalkohol und Wasser (0,5 für Wasser, 1,3 für gesättigte Ammonsulfatlösung) derart, daß ein auf einfache Ausschüttelung der Milchsäure basierendes Bestimmungsverfahren, wie es Ohlson angibt, keineswegs aussichtslos erscheint. Die analytischen Belege allerdings, die der Autor beibringt, sind viel zu dürftiger Art, um über die Brauchbarkeit des Verfahrens ein Urteil zu gestatten. Ich habe daher meine erste Aufgabe darin erblickt, mir Klarheit darüber zu verschaffen, ob man

[1]) Vgl. O. Neubauer, Abderhaldens Handbuch d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 2. Tl., 1255—1259. 1912.

[2]) E. Ohlson (Phys. Inst. Lund), Skand Archiv f. Physiol. 33, 231—234. 1916.

auf dem Ohlsonschen Prinzipe eine praktischen Anforderungen genügende Extraktionsmethode tatsächlich zu basieren vermag.

2. Ein weiterer, wichtiger Punkt, der dringend der Klärung bedarf, ist die Verankerung der Milchsäure an Eiweißkörper. Aus Untersuchungen Mondscheins[1]) über quantitative Bestimmung der Milchsäure bei Gegenwart von Eiweißkörpern schien hervorzugehen, daß, wenn man in üblicher Weise die Bestimmung der Milchsäure einfach im Kochextrakt von Organen vornimmt, ein erheblicher Teil (etwa ein Viertel) der Milchsäure der Bestimmung entgehen, im Koagulum zurückbleiben und erst durch ein Aufschließungsverfahren der Bestimmung zugeführt werden kann. (Verflüssigung des Koagulums durch Erwärmen mit Lauge, Enteiweißen der albuminathaltigen Lösung durch Sättigen mit Kochsalz.) Gegenüber dieser Auffassung ist die Frage aufgeworfen worden, ob die beim Aufschließungsverfahren zutage tretende Milchsäure nicht vielleicht zum Teile der Einwirkung des Alkalis auf im Koagulum zurückgebliebene Glykogenreste u. dgl. zurückzuführen sei[2]). Dies ist nun wohl kaum in derartigem Umfange anzunehmen. Auch ist die Tatsache der Verankerung von Milchsäure im Eiweißkoagulum seitdem von anderer Seite her durch Joshikawa[3]) auf polarimetrischem Wege bestätigt worden. Aber eben bei Nachrechnung der Versuche dieses letzteren Autors ist es Prof. Fürth aufgefallen, daß jene Milchsäuremengen, welche der Genannte bei Anwendung des Aufschließungsverfahrens aus dem Koagulum erhalten hatte (z. B. bei einem Versuche 0,533 g im Kochextrakte, 0,016 g im Koagulum) um sehr vieles geringer waren, als die Ausbeuten Mondscheins und es ergab sich der Verdacht, daß der Letztgenannte vielleicht infolge eines methodischen Fehlers, etwa infolge unvollkommener Enteiweißung seines Extraktes u. dgl. einer Täuschung anheimgefallen sei und die Mengen der aus dem Koagulum erhältlichen Milchsäure erheblich überschätzt habe. Dies machte eine Klarstellung und eine eventuelle Modifikation des Aufschließungsverfahrens unerläßlich.

3. Auch abgesehen davon, ergab es sich bald, daß die Ausschüttelung von Milchsäure mit Amylalkohol aus wässerigen

[1]) J. Mondschein (Phys. Inst. Wien), diese Zeitschr. 42, 105. 1912.
[2]) Vgl. M. Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chemie 89, 40. 1914.
[3]) J. Joshikawa (Kioto), Zeitschr. f. physiol. Chemie 87, 405. 1913.

Lösungen nur dann Aussicht auf Erfolg habe, wenn man derselben eine vollständige Enteiweißung vorangehen läßt. Für eine solche erwies sich die von Ohlson empfohlene Ammonsulfatsättigung unter Zusatz von Schwefelsäure als keineswegs ausreichend und es drängte sich die Frage auf, wie diese Enteiweißung praktisch durchzuführen sei. Es ergab sich da insbesondere weiterhin die Frage, ob die Enteiweißung mit Hilfe von Sublimat nach Schenk, wie sie von Embden empfohlen wird, oder ob eine solche mit Hilfe von Phosphorwolframsäure, wie sie im hiesigen Laboratorium Anwendung zu finden pflegt, in diesem Falle vorzuziehen sei. Dabei mußte das Verfahren womöglich so ausgestaltet werden, daß es ebensogut auf Blut und andere eiweißhaltige, tierische Flüssigkeiten als auf Organe zur Anwendung gebracht werden konnte.

4. An der Hand eines einwandfreien Milchsäurebestimmungsverfahrens konnte man sodann an die Frage herantreten, wie das maximale Milchsäurebildungsvermögen am einfachsten ermittelt werden könnte. Fürth[1]) hatte dies in der Weise bewerkstelligt, daß er Parallelproben des zerkleinerten Organes der Autolyse in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von Toluol und Chloroform unterworfen hat; von Zeit zu Zeit wurde eine Probe entnommen und die Milchsäure darin bestimmt. Es ergab sich nun das Postulat, diesen überaus umständlichen und zeitraubenden Vorgang soweit als tunlich zu vereinfachen.

5. Bei Ausarbeitung eines Verfahrens zur Ermittlung des maximalen Milchsäurebildungsvermögens eines Organes mußten die Beobachtungen des Embdenschen Institutes[2]) gebührend berücksichtigt werden, denen zufolge passender Alkalizusatz die im Muskelpreßsafte eines Froschmuskels bei der Wärmestarre gebildete Milchsäuremenge ganz erheblich zu steigern vermag. Es mußte festgestellt werden, ob diese Beobachtung ganz allgemein auch für Warmblütlermuskeln bzw. auch für andere Organe zutrifft in dem Sinne etwa, daß ein Organbrei nur dann sein maximales Milchsäurebildungsvermögen zu entfalten vermag, wenn die entstehende Milchsäure jeweilig durch Alkali abgesättigt und derart einer Steigerung der H-Ionen-

[1]) Fürth, O., diese Zeitschr. **69**, 199. 1913.

[2]) Kondo, K., diese Zeitschr. **45**, 63. 1913. — Laquer, F., Zeitschr. f. physiol. Chemie **93**, 46. 1915.

konzentration, welche im Sinne einer Selbststeuerung hemmend wirken könnte, vorgebeugt wird.

6. An der Hand eines vereinfachten Vorganges mußte es dann sehr wünschenswert erscheinen, verschiedene Organe eines und desselben Individuums in bezug auf ihr maximales Milchsäurebildungsvermögen miteinander zu vergleichen. Denn wir wissen zwar, daß die so viel studierte postmortale Säurebildung im Muskel nichts für diesen Spezifisches ist, vielmehr nur einen speziellen Fall eines für alle Gewebe gültigen Vorganges bildet. Wir wissen ferner, daß die postmortale Milchsäurebildung als Fortsetzung eines vitalen Vorganges doppeltes Interesse beanspruchen kann. Wir wissen aber kaum etwas Näheres darüber, in welchem Umfange die verschiedenen Organe und Gewebsformen zur Milchsäurebildung befähigt sind. Da wir allen Grund haben, einen Ursprung der Milchsäure aus Kohlenhydraten anzunehmen, wäre es auch interessant zu erfahren, ob ein Zusammenhang zwischen dem Milchsäurebildungsvermögen eines Organes, also dem Lactacidogenvorrate im Sinne Embdens und seinem Kohlenhydratbestande existiert.

7. Schließlich haben Gelegenheitsbeobachtungen unsere Aufmerksamkeit auf eine bisher kaum beachtete Fehlerquelle der Milchsäurebestimmung geleitet, nämlich die Anhydridbildung, welche in wässerigen Lösungen reiner Milchsäure in sehr merklicher Weise zutage tritt und daher auch in Organextrakten, bei längerer Aufbewahrung derselben, vor allem aber in Gärungsgemischen sicherlich nicht ausgeschlossen werden kann.

Ich gehe nunmehr zur Mitteilung meiner Versuche über.

II. Ausschüttelung der Milchsäure nach Ohlson.

Ohlson (l. c.) gibt für die Abtrennung der Milchsäure folgende Vorschrift:

„Die zu extrahierende Flüssigkeit wird mit Ammonsulfat gesättigt. Bei Anwesenheit von Eiweißstoffen werden diese dabei ausgefällt und können nach 12 Stunden abfiltriert werden. Das Filtrat wird mit $^1/_{10}$ seines Volumens 50% Schwefelsäure vorsichtig versetzt und in einem Scheidetrichter mit dem doppelten Volumen Amylalkohol gut durchgeschüttelt. Nachdem die Schichten sich getrennt haben, wird die Wasserlösung abgelassen und der Amylalkohol in einen anderen Scheidetrichter übergeführt und mit dem gleichen Volumen 2% Natriumcarbonatlösung geschüttelt, wonach er in den ersten Scheidetrichter zurückgeführt und

mit der milchsäurehaltigen Flüssigkeit wieder geschüttelt wird usw. Nach fünf Extraktionen ist die Milchsäure quantitativ in die Natriumcarbonatlösung übergeführt. Diese enthält indessen auch ein wenig Amylalkohol gelöst, der bei der Bestimmung der Milchsäure einen Fehler veranlaßt. Der Amylalkohol muß darum zuerst weggeschafft werden. Dies wird durch Aufkochen der Natriumcarbonatlösung nicht erzielt, wohl aber durch dreimalige Extraktion derselben mit $^1/_5$ ihres Volumens Benzol. Die Natriumcarbonatlösung wird mit Schwefelsäure annähernd neutralisiert und kann dann zur Bestimmung der Milchsäure direkt verwendet werden. Die ganze Extraktion, inklusive Benzolbehandlung, wird in weniger als einer Stunde bequem ausgeführt, d. h. in einer Zeitdauer, die kaum diejenige übersteigt, die zur Vorbereitung einer Ätherextraktion im Lindtschen Apparat beansprucht wird."

1. Ich habe mir nun zunächst wässerige Lösungen von reinem, milchsaurem Lithium (Kahlbaum) von genau bekanntem Gehalte hergestellt und die Milchsäure darin direkt nach dem Verfahren von Fürth und Charnass bzw. nach der von Embden empfohlenen Modifikation[1]) dieses Verfahrens (wobei der abdestillierende Aldehyd in eisgekühlter Bisulfitlösung direkt aufgefangen wird) bestimmt.

	verwend.	gefund.
a) Nach Embden Oxyd. mit $KMnO_4$ $^n/_{50}$ Milchs. Lith. entsprechend freie $C_3H_6O_3$	0,1691 g,	0,1584 g = 93,58%
b) Desgl.	0,1691 g,	0,1530 g = 90,18%
c) Desgl.	0,1691 g,	0,1593 g = 94,21%
d) Nach Embden $KMnO_4$ $^n/_{10}$ (Korrektur nach Fürth u. Charnass), Milchs. Lith. entsprechend freie $C_3H_6O_3$. . .	0,1691 g,	0,1640 g = 97,04%
e) Nach Fürth u. Charnass, $KMnO_4$ $^n/_{50}$ (Korrektur nach Fürth u. Charnass) Milchs. Lith. entsprechend freie $C_3H_6O_3$	0,1452 g,	0,1372 g = 94,40%
f) Nach Fürth u. Charnass $KMnO_4$ $^n/_{50}$ Milchs. Lith. entsprechend freie $C_3H_6O_3$	0,1452 g,	0,1363 g = 93,87%
g) Desgl.	0,1452 g,	0,1286 g = 90,63%

Es macht daher keinen wesentlichen Unterschied, ob man nach dem Vorgange von Fürth und Charnass oder nach der Modifikation von Embden arbeitet. Energische Eiskühlung, wie sie Embden vorschreibt, ist unerläßlich. So erhielt ich z. B. bei einer Parallelprobe, die ohne Kühlung durchgeführt wurde, nur eine Ausbeute von 81%. Andere Versuche, die ich infolge zeitweiliger Schwierigkeiten der Eisbeschaffung ohne Kühlung

---

[1]) Neubauer, l. c.

durchgeführt hatte, ergaben zum Teile noch ungünstigere Resultate.

2. Nunmehr wurde eine wässerige Lösung von milchsaurem Lithium genau nach Ohlson ausgeschüttelt und die Bestimmung nach Fürth - Charnass durchgeführt.

a) Milchs. Lithium, entspr. freier Milchsäure: verwendet 0,0806 g, gefunden 0,0756 = 93,8%;
b) Milchs. Lithium, entspr. freier Milchsäure: verwendet 0,0806 g, gefunden 0,0765 g = 94,8%.

Es gelingt also tatsächlich nach dem Verfahren Ohlsons, die Milchsäure aus der reinen wässerigen Lösung des Salzes in recht vollständiger Weise zu extrahieren.

3. Wie verhält es sich nun aber, wenn man die Ausschüttelung aus einer eiweißhaltigen Lösung vornimmt?

Wir haben, um dies festzustellen, eine Lösung von milchsaurem Lithium mit Rinderblutserum und einer zum Infreiheitsetzen der Milchsäure erforderlichen, bzw. überschüssigen Menge von Schwefelsäure versetzt und nunmehr die Ausschüttelung nach Ohlson durchgeführt.

a) 20 ccm $^n/_{10}$ milchs. Lith. + 50 ccm Blutserum + 20 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4: Ausbeute = 79,8%;
b) 20 ccm $^n/_{10}$ milchs. Lith. + 50 ccm Blutserum + 80 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4: Ausbeute = 81,5%.

Tatsächlich ist aber die Ausbeute noch etwas ungünstiger, da der Milchsäuregehalt des Blutserums dabei nicht berücksichtigt ist.

Wo ist der Milchsäurerest geblieben? Nach Mondschein wohl im Eiweißniederschlage, der nach Sättigung mit Ammonsulfat ausgefallen war. In der Tat fanden sich nach dem Aufschließungsverfahren (Verflüssigung mit Natronlauge, Enteiweißung durch Kochsalzsättigung usw.) noch weitere 9,1%, derart, daß die Gesamtausbeute etwa 90% betragen würde.

4. Es ergab sich nun weiterhin die Frage, ob man diesem Milchsäureverluste vorzubeugen vermag, wenn man die Enteiweißung statt durch Ammonsulfatsättigung, etwa durch Fällung mit Quecksilberchlorid in salzsaurer Lösung nach Schenk vornimmt.

a) Zu diesem Zwecke wurden 40 ccm Lithiumlactatlösung (auf freie Milchsäure umgerechnet 0,1612 g Milchsäure enthaltend) mit 100 ccm Pferde-Oxalatplasma und 100 ccm Wasser versetzt; dazu 200 ccm einer 2proz. Salzsäure, ferner 200 ccm einer 5proz. Sublimatlösung. Der gut abgesetzte Niederschlag wurde abgenutscht, nachgewaschen, das Filtrat mit H_2S vom Hg, durch einen Luftstrom vom H_2S befreit und das klare, wasserhelle Filtrat nunmehr nach Ohlson weiterverarbeitet. Es resultierten 0,1550 g Milchsäure.

Der massenhafte Eiweißniederschlag wurde nunmehr in 30proz. Natronlauge in der Wärme gelöst, die Lösung durch Zusatz konzentrierter Schwefelsäure neutralisiert, mit Ammonsulfat gesättigt, der Eiweißniederschlag abfiltriert, das Filtrat mit H_2SO_4 angesäuert und nach Ohlson weiter verarbeitet. Es resultierten so weitere 0,0140 g Milchsäure.

Eine parallele „blinde" Probe, d. h. Oxalatplasma ohne Zusatz von Lithiumlactat ergab 0,0130 g Milchsäure im Filtrat der Sublimatfällung.

Es entspricht dies der Größenanordnung der Werte, die in Embdens Laboratorium für den Milchsäuregehalt des normalen Blutserums ermittelt worden sind. So fand K. v. Noorden (Diese Zeitschr. **45**, 96. 1912) in 100 ccm Hundeblutserum 0,012—0,020 g Milchsäure; H. Fries (Diese Zeitschr. **35**, 379. 1911) bei 12 Blutuntersuchungen normaler und rekonvaleszenter Menschen 6mal Milchsäure, und zwar pro 100 ccm 0,0039 bis 0,0132 g.

Die Effektivausbeute an Milchsäure betrug sonach:

Filtrat	0,1550 g	Milchsäure
Niederschlag	0,0140 g	„
	0,1690 g	
ab $C_3H_6O_3$ im zugesetzten Blutserum	0,0130 g	
	0,1560 g	statt 0,1612 g = 97%.

b) Ein in genau gleicher Weise durchgeführter Parallelversuch ergab:

Filtrat	0,1440 g	Milchsäure
Niederschlag	0,0465 g	„
	0,1905 g	
ab $C_3H_6O_3$ im zugesetzten Blutserum	0,0180 g	
	0,1725 g	statt 0,1612 g = 107%.

Beachtet man, daß unsere direkten Milchsäurebestimmungen in reinen, wässerigen Lösungen ja immer etwas zu kleine Werte ergeben haben und daß bei den zahlreichen Manipulationen ja doch Verluste sicherlich unmöglich ganz vermieden werden konnten, so läßt sich die Annahme einer Neubildung von Milchsäure, etwa durch Alkalieinwirkung auf im Eiweißkoagulum enthaltene Substanzen (vgl. Oppenheimer l. c.) namentlich im Falle b) nicht von der Hand weisen.

Immerhin ist auch hier die Extraktion der Milchsäure nach Ohlson im wesentlichen offenbar gelungen.

Wenn wir dennoch von der Schenkschen Enteiweißungstechnik wieder abgekommen sind, so geschah dies, weil zwei weitere Versuche aus uns unbekannten Gründen durchaus unbefriedigende Resultate ergeben hatten und ein großer Teil der zugesetzten Milchsäure vermutlich infolge eines Zersetzungsvorganges in Verlust geraten war.

III. Milchsäuregehalt des Eiweißkoagulums.

Unsere nächste Aufgabe war nunmehr, sachlich festzustellen, ob Mondschein die Menge der im Eiweißkoagulum fixierten Milchsäure nicht, wie wir es vermuteten, überschätzt habe.

Ich ging nun derart vor, daß ich Muskelbrei in Portionen zu je 50 oder 100 g im frischen oder autolysierten Zustande in Arbeit nahm. Die einzelnen Muskelportionen wurden viermal mit Wasser ausgekocht und die Acidität der Extraktionsflüssigkeit unter Zusatz von Phenolphthalein einfach titrimetrisch ermittelt. Man erhält so, zum mindesten, wenn es sich um normale frische Muskulatur handelt, einen ungefähren, wenn auch sicherlich recht groben Schätzungswert für die Menge der darin enthaltenen Milchsäure[1]).

Nunmehr wurde das Koagulum in der Weise weiter verarbeitet, wie es Mondschein seinerzeit getan hat[2]).

Das abfiltrierte Koagulum wurde je 50 g Muskel entsprechend in 50 ccm Wasser verteilt; sodann fügte ich 10 ccm 10proz. NaOH hinzu. Nachdem die Eiweißmasse zu einer Gallerte aufgequollen war, wurde durch vorsichtiges Erwärmen die Verflüssigung herbeigeführt. Nunmehr wurde die Lösung mit 100 ccm einer gesättigten Kochsalzlösung versetzt, aufgekocht und in der Siedehitze mit Kochsalz in Substanz gesättigt. Dabei fiel die Hauptmenge der Eiweißkörper aus und wurde abfiltriert. Ein der Fällung entgangener Eiweißanteil wurde durch Zusatz von H_2SO_4 bis zur schwach saueren Reaktion ausgefällt und beseitigt.

Mondschein hatte nun weiter, in der Meinung, das Filtrat enthalte nunmehr weder Eiweiß noch irgendeine andere Substanz außer Milchsäure, welche bei der Oxydation Aldehyd liefert, dasselbe, ohne ein weiteres Extraktionsverfahren einzuschalten, direkt der Bestimmung nach Fürth-Charnass unterworfen.

Ich habe dagegen das Filtrat zunächst nach Ohlson ausgeschüttelt und erst den resultierenden Extrakt nach Fürth-Charnass verarbeitet.

Ich erhielt so folgende Resultate:

1. 50 g Muskelbrei aus möglichst frischer menschlicher Leichenmuskulatur viermal mit Wasser ausgekocht. Die Titrationsacidität

---

[1]) S. Näheres diesbezgl.: Fürth, O., diese Zeitschr. 69, 205. 1915, sowie J. Mondschein, diese Zeitschr. 42, 115. 1912.

[2]) Mondschein, l. c. S. 118.

(gegen Phenolphthalein, auf Milchsäure berechnet) betrug 0,1518 g Milchsäure für 100 g Muskel.

2. a) Derselbe Muskelbrei nach achttägiger Aufbewahrung in der Kälte; wie oben verarbeitet:

Im Extrakt ergab die Titration 0,280 g Milchsäure für 100 g Muskel das Koagulum nach Mondschein aufgeschlossen, mit Schwefelsäure angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt, nach Ohlson weiterverarbeitet, ergab: 0,030 g Milchsäure für 100 g Muskel.

b) Koagulum nach Mondschein aufgeschlossen, das natriumchloridhaltige Filtrat mit H_2SO_4 angesäuert; das so gewonnene Filtrat erwies sich jedoch noch nicht als eiweißfrei; die letzten Eiweißreste wurden durch Zusatz von Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines Überschusses beseitigt. Schließlich wurde das letzte Filtrat statt mit Ammonsulfat mit Natriumsulfat gesättigt und nach Ohlson ausgeschüttelt; es fanden sich 0,080 g Milchsäure für 100 g Muskel.

3. Frischer Hundemuskel, wie unter 2. verarbeitet.

Titration des Extraktes:	0,31 g	Milchsäure	für	100	g	Muskel
Koagulum a)	0,027 g	„	„	100	g	„
b)	0,030 g	„	„	100	g	„

4. Autolysierte menschliche Leichenmuskulatur.

Portionen zu je 100 g des Muskelbreies wurden mit 200 ccm physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von Toluol in Glasbüchsen mit gut eingeschliffenen Stopfen im Brutofen der Autolyse unterworfen.

a) Verarbeitung nach dreitägiger Autolyse:

Titrationsacidität des Extraktes:	0,321 g	Milchsäure	für	100	g	Muskel
	0,349 g	„	„	100	g	„
Koagulum wie unter 2. verarbeitet	0,059 g	„	„	100	g	„

b) Verarbeitung nach achttägiger Autolyse:

Titrationsacidität des Extraktes:	0,380 g	Milchsäure	für	100	g	Muskel
	0,373 g	„	„	100	g	„
	0,376 g	„	„	100	g	„
	0,381 g	„	„	100	g	„

Kochextrakt nach vollständiger Enteiweißung durch Fällung mit Phosphorwolframsäure, mit Natriumsulfat gesättigt, dann weiter nach Ohlson verarbeitet, ergab:

	0,323 g	Milchsäure	für	100	g	Muskel
	0,299 g	„	„	100	g	„
Koagulum (wie) oben).	0,042 g	„	„	100	g	„

Überblicken wir nunmehr obige Resultate, so ergibt sich, daß von der Gesamtheit der im Muskel enthaltenen Milchsäure (Extrakt + Koagulum) auf die aus dem Koagulum erhältliche Menge entfallen waren

im Versuch 1 = 32%		im Versuch 3b = 9%
2a = 10%		4a = 15%
2b = 22%		4b = 12%.
3a = 8%		

Aus Mondscheins Analysen schien dagegen hervorzugehen, daß etwa ein Viertel der Gesamtmilchsäure der Extraktion durch kochendes Wasser entgangen und erst bei der Aufschließungsprozedur zum Vorschein gekommen sei.

Wir müssen daher annehmen, daß die bei Aufschließung des Muskelkoagulums erhältlichen Milchsäuremengen von Mondschein seinerzeit überschätzt worden sind.

Offenbar hat der Fehler in seiner Methodik darin bestanden, daß er nach Enteiweißung seiner Albuminatlösung durch Kochsalzsättigung und Schwefelsäurezusatz die erhaltenen, wasserhellen Filtrate für völlig eiweißfrei gehalten hat (s. o.). Dieselben enthalten aber noch geringe Eiweißreste; diese vermochten bei direkter Oxydation noch etwas Aldehyd zu liefern, welcher sich zu dem durch Oxydation der Milchsäure erhaltenen Aldehyd hinzuaddiert hatte.

M. Oppenheimer hat gegenüber Mondschein folgenden Einwand geltend gemacht: „Die bekannte Tatsache, daß Kohlenhydrate bei Behandlung mit Alkali leicht, sogar bis zu recht beträchtlichen Mengen in Milchsäure umgewandelt werden können, läßt die Gefahr nicht ausschließen, daß nach dem Mondscheinschen Verfahren durch Umwandlung im Muskel vorhandener Kohlenhydrate in Milchsäure eine tatsächlich nicht vorhandene Milchsäuremenge vorgetäuscht wird. Ebenso könnte vielleicht durch Alkali Milchsäure aus einer Milchsäurevorstufe im Muskel, dem Lactacidogen, entstehen ... Es ist seit langem bekannt daß wesentliche Mengen Zucker ins Eiweißkoagulum gehen und von diesem festgehalten werden ...“

Dazu ist folgendes zu bemerken: Die aus dem Koagulum erhältlichen Mengen Milchsäure sind sicherlich zu groß, als daß diese Erklärung zutreffen könnte. So erhielt ich aus menschlichen Leichenmuskeln 0,03—0,08% als Milchsäureausbeute aus den Koagulis. Nun enthalten Säugetiermuskeln nach Böhm in der Regel nur 0,1—1,0% Glykogen; menschliche Muskulatur nach Moscati im Mittel nur 0,4%. Dieses Glykogen ist aber zur Zeit, wo ich ebenso wie Mondschein die Muskeln in Arbeit genommen hatte, sicherlich zum allergrößten Teile längst der Verzuckerung anheimgefallen. Daß aber weitaus der größte Teil des Zuckers beim viermaligen Auskochen des Muskelbreies in das Extraktionswasser übergehen mußte, unterliegt keinem Zweifel. Es konnten also nur geringfügige Glykogen- oder Zuckerreste im Koagulum zurückgeblieben sein. Nun ist es ja allgemein bekannt, wie resistent Glykogen gegen konzentriertes Alkali auch in der Wärme ist. Jedoch auch Zucker wird erst durch eine langdauernde Einwirkung von Alkali (und um eine solche handelt es sich ja in unserem Falle keineswegs) nur sehr langsam in Milchsäure umgewandelt. Wäre dies nicht der Fall, so hätte ja z. B. die Zuckerbestimmung nach Fehling keinen Sinn.

Die Möglichkeit, daß die im Koagulum gefundene Milchsäure einer besonderen Kohlenhydratform, einem Lactacidogen entstammen könnte, welches vielleicht zum Eiweiß in Beziehung steht und beim Auskochen im Koagulum zurückbleibt, ist ohne weiteres zuzugeben. Bei Untersuchungen jedoch, welche auf das Maximum des Milchsäurebildungsvermögens abzielen, könnte man es sich ja ohne weiteres gefallen lassen, wenn eben auch dieser Lactacidogenanteil durch die Alkalieinwirkung in Milchsäure umgewandelt würde.

Die Tatsache aber, daß die Milchsäure zu den Eiweißkörpern des Muskels in enge Beziehungen trete, erscheint, abgesehen von den zahlreichen Analysen Mondscheins durch ein sehr großes Tatsachenmaterial jedem Zweifel entrückt[1]).

Immerhin tritt die Menge der aus dem Eiweißkoagulum erhältlichen Milchsäure gegenüber der in den Kochextrakt übergehenden im allgemeinen offenbar so weit zurück, daß es für die Mehrzahl physiologischer Untersuchungen in praxi genügen dürfte, sich auf die Untersuchung des Kochextraktes zu beschränken.

IV. Praktische Handhabung des Ausschüttelungsverfahrens zur Milchsäurebestimmung in Muskeln.

Es sei nun in Kürze mitgeteilt, welcher Vorgang zum Zwecke der Milchsäurebestimmung nach dem Ausschüttelungsverfahren sich mir nach zahlreichen Fehlversuchen als praktisch erwiesen hat.

Ich bemerke, daß die Ausschüttelung nur dann — und dieser Punkt scheint mir von besonderer Wichtigkeit — wirklich exakt durchgeführt werden kann, wenn die auszuschüttelnde Flüssigkeit völlig eiweißfrei ist. Ist dies nicht der Fall, so bildet sich in der Regel an der Grenze zwischen der Flüssigkeit und dem Amylalkohol eine trübe, haltbare Emulsion, welche eine scharfe Trennung der Schichten unmöglich macht. Daß die beiden zur Verwendung gelangenden Scheidetrichter mit gut eingeschliffenen Glasstopfen versehen sein müssen und daß es peinlich sorgfältiger Arbeit bedarf, um bei den zahlreichen Prozeduren erhebliche Verluste zu vermeiden, ist selbstverständlich. Da, wo es auf sehr große Genauigkeit ankommt und wo man die Lindtsche Apparatur bequem zur Hand hat, wird sicherlich auch fernerhin die

[1]) Vgl. die eingehende Erörterung dieses Problems bei O. Fürth, Die Kolloidchemie des Muskels und ihre Beziehungen zu den Problemen der Kontraktion und der Starre in L. Ashers und K. Spiros Ergebnissen der Physiologie XVII, S. 401—406. 1919. (Abschnitt: Die Bildung von Säureproteinen innerhalb des Muskelgewebes.)

Extraktion mit dem Lindtschen Apparate den Vorzug verdienen. Für die meisten physiologischen Untersuchungen wird man aber, wie ich meine, das so viel einfachere und weit weniger zeitraubende Ausschüttelungsverfahren um so mehr in Anwendung bringen können, als die Verluste bei demselben, die sicherlich nicht ganz zu vermeiden sind, in der Regel neben anderen unvermeidlichen Fehlerquellen schwerlich sehr ins Gewicht fallen dürften.

Der Vorgang der Milchsäurebestimmung speziell im Muskel[1]) gestaltet sich etwa folgendermaßen:

Eine abgewogene Portion des fein gehackten Organbreies, etwa 100 g entsprechend, wird in einer Email- oder Porzellanschale über freier Flamme vier Male mit erneuerten Portionen destillierten Wassers je 10 Minuten lang ausgekocht. Die Extraktionsflüssigkeit wird durch ein Filter gegossen (wobei die Hauptmenge des Organbreies in der Schale zurückbleibt) und in einen 1 Liter fassenden Meßkolben hineinfiltriert.

Man füllt auf einen Liter auf, mischt gut durch und teilt die Extraktionsflüssigkeit in zwei Portionen zu je 500 ccm. Die eine Hälfte bewahrt man entweder für eine Parallelbestimmung auf oder aber — und das wird in der Regel erwünscht sein — man verwendet sie, um darin nach Zusatz von alkoholischer Phenolphthaleinlösung die Gesamtacidität durch Titration mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge zu ermitteln.

Die andere Hälfte wird, wenn es sich um Muskel handelt, mit 30 ccm einer 10 proz. Lösung von Kahlbaumscher Phosphorwolframsäure versetzt, wobei ein voluminöser Niederschlag ausfällt. Der genannte Zusatz genügt in der Regel bei Muskelextrakten, um alle Eiweißkörper, nicht aber um alle anderen durch das Reagens fällbare Substanzen auszufällen. Der Niederschlag wird mit einem Saugfilter abgetrennt. Hat man den Zusatz richtig getroffen, so soll das Filtrat keinen Überschuß von Phosphorwolframsäure enthalten; man überzeugt sich in einer kleinen Probe, daß Sulfosalicylsäure keinen Niederschlag mehr erzeugt, daß sie demnach eiweißfrei ist; dagegen wird ein Mehrzusatz von Phosphorwolframsäure sogleich oder nach einer Weile noch eine weiße Fällung hervorrufen.

---

[1]) In bezug auf die Frage der Anwendbarkeit des Ohlsonschen Ausschüttelungsverfahrens auf andere Organe, insbesondere auf die Leber sind zur Zeit die Versuche in diesem Laboratorium noch im Gange.

Das enteiweißte Filtrat wird nunmehr sehr genau neutralisiert und am Wasserbade stark eingeengt, sodann mit einigen Tropfen Schwefelsäure angesäuert. Dabei scheidet sich noch eine geringe Menge eines Phosphorwolframates, das bis dahin in Lösung geblieben war, ab und wird abfiltriert. Man filtriert die Flüssigkeit, deren Menge keinesfalls mehr als 100 ccm betragen soll, am besten direkt in den Scheidetrichter hinein, in dem man die Ausschüttelung mit Amylalkohol vornehmen will. Man überzeugt sich mit Hilfe von Kongopapier davon, daß ein Überschuß freier Mineralsäure vorhanden ist; erforderlichenfalls setzt man noch ein paar Tropfen HCl hinzu. (Eine Sättigung der zu extrahierenden Flüssigkeit mit Ammonsulfat, wie sie Ohlson vorschreibt, halten wir nicht für unentbehrlich. Dieselbe ist, wenn man die zu extrahierende Flüssigkeit auf ein ausreichend geringes Volumen eingeengt hat, überflüssig und zieht dieselbe eine weitere Filtration und die durch eine solche bedingte Verluste nach sich. Eine Ausschüttelung der unfiltrierten Flüssigkeit ist aber untunlich.)

Nunmehr wird die Flüssigkeit im Scheidetrichter mit dem mehrfachen Volumen Amylalkohol versetzt und der weitere Ausschüttelungsvorgang in der von Ohlson angegebenen Weise vorgenommen.

Will man auch die aus dem Koagulum erhältliche Milchsäure quantitativ bestimmen, so geht man nach der Vorschrift Mondscheins vor (s. o.), indem man das Koagulum in Wasser verteilt, Natronlauge hinzufügt, durch vorsichtiges und nicht unnötig lang fortgesetztes Erwärmen verflüssigt und die Hauptmenge der Eiweißkörper durch Sättigung mit Kochsalz beseitigt und filtirert. Das Filtrat wird durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure schwach angesäuert und tropfenweise mit Phosphorwolframsäure — unter Vermeidung eines Überschusses — versetzt, wobei die letzten noch in Lösung befindlichen Eiweißreste ausfallen. Man erhält so ein wasserhelles Filtrat, das unschwer wie oben mit Amylalkohol ausgeschüttelt werden kann.

V. Einfluß der Alkalescenz des Mediums auf das Milchsäurebildungsmaximum.

Laquer (l. c.) hat in Embdens Laboratorium die interessante Beobachtung gemacht, daß die in Froschmuskeln beim Eintritte der Wärmestarre gebildete Milchsäuremenge durch Alkalizusatz gewaltig gesteigert werde. So wurde in Froschmuskeln nach zweistündigem Erwärmen auf 45° gefunden:

in physiologischer NaCl-Lösung	in 2 proz. $NaHCO_3$-Lösung
0,369 = 0,446%	0,565 = 0,662%
0,338 = 0,428%	0,659 = 0,803%

Bereits früher hatte Kondo (l. c.) im gleichen Laboratorium die Wahrnehmung gemacht, daß Säurezusatz zu Muskelpreßsaft die Milchsäurebildung hemmt, wogegen Zusatz von $NaHCO_3$ dieselbe begünstigt. Er hat diese Beobachtung in dem Sinne gedeutet, daß die Milchsäurebildung bei ungenügendem Gehalte des Preßsaftes an Alkali durch einen Vorgang der Selbststeuerung infolge Eintrittes einer bestimmten H-Ionenkonzentration zum Stillstande gelange.

Fürth[1]) hat kürzlich darauf hingewiesen, daß die Gegenwart von Alkali möglicherweise einfach die Bindung von Milchsäure an Muskelproteine verhindern und so einer Maskierung derselben bei den üblichen Bestimmungsmethoden entgegenwirken könnte.

Um nun festzustellen, ob ähnliches, wie es Laquer beim Froschmuskel beobachtet hatte, auch beim Warmblüter zutage tritt, habe ich mehrere Versuche mit menschlicher Muskulatur ausgeführt, die ich in Parallelversuchen der Autolyse einerseits in 0,9 proz. NaCl, andererseits in 2 proz. $NaHCO_3$ unter Toluolzusatz unterworfen hatte.

Versuch I.

Muskelbrei in Portionen zu 100 g mit 200 ccm 0,9% NaCl bzw. 2% $NaHCO_3$ und etwas Toluol in Glasbüchsen mit eingeschliffenem Stopfen der Autolyse im Brutschranke unterworfen. Die Milchsäurebestimmung wurde nach dem im Abschnitte IV beschriebenen Vorgange vorgenommen.

	Titrationsacidität:	Milchsäuregehalt nach d. Ausschüttelungsverfahr.:	
a) Autolyse in 0,9% NaCl			
Nach 3 Tagen bei 40°	0,35 g Milchsäure	0,2410 g 0,2940 g 0,2510 g	Mittel 0,2818 g $C_3H_6O_3$
„ 5 „ „ 40°		0,2903 g 0,2723 g 0,3017 g	
b) Autolyse in 2% $NaHCO_3$			
Nach 3 Tagen bei 40°		0,366 g	
„ 3 Wochen „ 40°		0,2788 g 0,2544 g	Mittel 0,2666 g

[1]) Fürth, Kolloidchemie des Muskels, l. c., S. 217.

	Autolyse in 0,9% NaCl	Autolyse in 2% $NaHCO_3$
Versuch 2. Langdauernde Autolyse.		
Nach 14 Tagen bei 40°		0,468 g, 0,440 g } Mittel 0,454 g
„ 20 „ „ 40°	0,4650 g, 0,5040 g } Mittel 0,4845 g	
„ 24 „ „ 40°	0,4462 g	
Versuch 3. Kurzdauernde Autolyse.		
Nach 14 Stund. bei 40°	0,3680 g $C_3H_6O_3$ (Titration: 0,37 g) Koagulum: 0,024 g	0,3760 g 0,3054 g (Im Koagulum: 0,010 g)
„ 41 „ „ 40°	0,341 g (Titration: 0,37 g 0,36 g)	0,400 g
Versuch 4.		
Nach 1 Tag bei 40°	0,189 g 0,166	0,271 g
„ 2 Tagen „ 40°	0,280 g	0,276 g
„ 3 „ „ 40°	—	0,186 g, 0,106 g
Versuch 5.		
Nach 1 Tag bei 40°	0,420 g	0,456 g, 0,404 g
„ 2 Tagen „ 40°	0,534 g	0,584 g, 0,548 g
„ 3½ „ „ 40°	0,583 g	0,504 g

Ein weiterer Versuch wurde mit Leberbrei menschlicher Provenienz vorgenommen:

Versuch 6.		
Nach 1 Tag	0,039 g	0,20 g
„ 2 Tagen	0,509 g	0,134 g, 0,110 g

Wenn wir unsere Resultate überblicken, werden wir zu dem Ergebnisse gelangen, daß auch bei der Autolyse von Warmblütermuskeln sich in einem alkalischen Milieu die Umwandlung des Lactacidogens unter Umständen in einem etwas schnelleren Tempo abspielen kann.

Das Milchsäuremaximum wird aber nach mehrtägiger Autolyse schließlich auch bei der Autolyse in physiologischer Kochsalzlösung erreicht werden.

Wir möchten der letzteren gegenüber der Autolyse in Bicarbonatlösung zum Zwecke der Ermittlung des Milchsäurebildungsmaximums von Organen aber insofern entschieden den Vorzug geben, als die in einem Organbrei angehäufte Milchsäuremenge, nachdem sie ein Maximum erreicht hat, eine Abnahme

erfahren kann[1]), eine derartige Milchsäurezerstörung aber (vgl. Versuch 1, 4, 6) durch die Alkalescenz des Mediums offenbar begünstigt wird.

VI. Milchsäurebildungsmaximum verschiedener Organe verglichen mit ihrem Kohlenhydratbestande.

Da wir allen Grund haben, die in Organen auftretende Milchsäure von dem Kohlenhydratbestande herzuleiten, erschien es von Interesse, festzustellen, ob sich beim Vergleiche verschiedener Organe desselben Individuums irgendeine Andeutung einer Proportionalität zwischen Milchsäurebildungsmaximum und dem gesamten Kohlenhydratbestande ergibt.

Um diesen letzteren (i. e. die Summe des in Zucker umgewandelten Glykogens + des als solchen vorhandenen Zuckers) in Organen zu bestimmen, haben wir uns die Erfahrungen von J. Parnas und R. Wagner[2]) zunutze gemacht.

Wir gingen derart vor, daß 50 g Organbrei zunächst dreimal mit Wasser aufgekocht wurden. Filtrat (A) und Koagulum wurden für sich weiter verarbeitet.

Das Koagulum wurde mit 2proz. Schwefelsäure in einer Reibschale möglichst fein zerrieben und die Suspension in einem Kölbchen mit aufgesetztem Trichter vier Stunden lang am Wasserbade erwärmt. Es wurde sodann mit Barytwasser nahezu neutralisiert, filtriert und das Filtrat nachgewaschen (Filtrat B).

Das erste Filtrat (A) wurde auf ca. 100 ccm eingeengt, mit Schwefelsäure auf 2% davon gebracht, vier Stunden am Wasserbade erwärmt, mit Barytwasser nahezu neutralisiert und filtriert (Filtrat C).

Die Filtrate B und C wurden nunmehr vereinigt und mit Natronlauge vollends neutralisiert. Zu der neutralen Lösung wurde (um die darin noch vorhandenen Kolloide zu beseitigen), eine etwa 20proz. wässerige Bleiacetatlösung im Überschusse hinzugefügt, das Filtrat durch Schwefelwasserstoff von Blei befreit, der Schwefelwasserstoff vertrieben, die Flüssigkeit neutralisiert, eingedampft und schließlich auf 100 ccm aufgefüllt. In aliquoten Teilen dieser Lösung (meist 20 ccm) wurde der Zucker durch mehrere Parallelbestimmungen nach Bertrand ermittelt.

Ich habe in dieser Art Gesamtkohlenhydratbestand und Milchsäurebildungsvermögen (zweitägige Autolyse bei 40° in physiologischer Kochsalzlösung) in einigen Organen eines 46jährigen

---

[1]) Vgl. diesbezüglich N. Ssobolew (Chem. Abt. d. Wiener Physiol. Inst.) Diese Zeitschr. 47 367. 1912.

[2]) J. Parnas und R. Wagner (Physiol. chem. Institut, Straßburg), diese Zeitschr. 61, 387. 1914.



kräftigen, einem Herzschlage erlegenen Mannes bestimmt. Für je 100 g Organ ergaben sich folgende Werte:

	Milchsäure (nach Ohlson)	Gesamtkohlenhydrat
Leber	0,44	1,10
Herz	0,36	0,19
Skelettmuskel	0,18	0,17
Niere	0,17	0,10

Diese Stichproben mögen genügen, um darzutun, daß von einer einfachen Proportionalität zwischen Milchsäurebildunvermögen und Kohlenhydratbestand der Organe nicht die Rede sein kann. Die Frage zu prüfen, ob diesbezüglich überhaupt irgendeine Gesetzmäßigkeit erkennbar sei, muß Gegenstand künftiger Untersuchungen sein, welche auch erst die Frage klarstellen müssen, in welcher Weise das Ohlsonsche Verfahren auf andere Organe als den Muskel anwendbar sei.

VII. Die Anhydridbildung in Milchsäurelösungen als Fehlerquelle bei der Milchsäurebestimmung.

Schließlich möchte ich über einige Beobachtungen berichten, welche eine bisher wenig beachtete Fehlerquelle bei Milchsäurebestimmungen betreffen, nämlich die Anhydridbildung bzw. Kondensationsvorgänge in Milchsäurelösungen.

Den vorliegenden Literaturangaben[1]) zufolge kämen für eine Anhydridbildung neben dem Anhydrid (Lactylmilchsäure)

$$CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO{-}O \cdot \underset{\displaystyle CH_3}{\overset{}{CH}} \cdot COOH$$

etwa auch das Lactid:

$$\begin{array}{l} COO{-}{-}CH \cdot CH_3 \\ \;| \qquad\quad | \\ C(HO){-}{-}CO \\ \;| \\ CH_3 \end{array}$$

sowie die Dilactylsäure:

$$\begin{array}{ccc} CH_3 & & CH_3 \\ | & & | \\ CH & {-}O{-} & CH \\ | & & | \\ COOH & & COOH \end{array}$$

in Betracht.

[1]) Vgl. Beilsteins Handb. 3. Aufl. S. 534. 1893; ferner V. Meyer und P. Jacobson, Lehrb. d. org. Chemie I. 753—754. 1893.

Nach R. Kunz[1]) sind alle offizinellen Milchsäurelösungen in hohem Grade anhydridhaltig. Der Gehalt an Anhydrid ist ziemlich schwankend. Jedenfalls erscheint es völlig unzulässig, die Milchsäure in derartigen Lösungen durch einfache Titration zu bestimmen. Der direkte Beweis für die Gegenwart des Anhydrids konnte allerdings durch die Analyse des Zinksalzes nicht in einwandfreier Weise erbracht werden. Bei einfacher Titration mit Phenolphthalein neutralisiert ein Molekül des Anhydrids als einbasische Säure ein Mol NaOH. Wird eine Lösung derselben 5 Minuten lang mit $^{n}/_{10}$-NaOH am Wasserbade erwärmt, so wird das Anhydrid zerlegt und kann der Gehalt an demselben aus dem Mehrverbrauche an neutralisierendem Alkali erschlossen werden.

Nach Jungfleisch und Godchot[2]) geht das r-Lactid bei Einwirkung von Wasser nicht sofort in 2 Moleküle Milchsäure über; es bildet sich zunächst Lactylmilchsäure, die dann unter weiterer Wasseraufnahme zu Milchsäure zerfällt. Löst man nämlich das Lactid in lauwarmem Wasser und neutralisiert die Lösung sofort mit Barytwasser, so wird nun die für Lactylmilchsäure berechnete Menge verbraucht.

1. Ich habe zunächst den Anhydridgehalt einer Milchsäure (Kahlbaum, spez. Gew. 1,21) zu ermitteln gesucht.

Es wurde eine approximativ 1 proz. Lösung derselben bereitet. Eine Probe, gegen Phenolphthalein titriert, ergab 0,84% Milchsäure. Nunmehr wurde eine andere Probe mit 20 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH zwei Stunden am Wasserbade erwärmt und zurücktitriert; es ergab die Titration 0,99%. Eine andere Probe nach fünf Minuten Erwärmen 0,99%; eine dritte Probe nach zehn Minuten 1,04%.

Die durch den Anhydridgehalt der Milchsäure bedingte Aciditätszunahme konnte somit mit 16% veranschlagt werden.

2. Dieselbe Milchsäurelösung wurde der Milchsäurebestimmung nach Fürth-Charnass in der Embdenschen Modifikation unterworfen.

a)	20 ccm	titr. Menge	0,1683 g	Milchsäure,	gefunden	0,1607 = 95,5%
b)	20 „	„ „	0,1683 g	„	„	0,1710 = 101,6%
c)	30 „	„ „	0,2524 g	„	„	0,2603 = 103,0%
d)	30 „	„ „	0,2524 g	„	„	0,2736 = 108,4%

Zieht man aber den Anhydridgehalt der titrierten Milchsäure in Betracht, so ergeben sich als Effektivausbeuten a) 80,2%, b) 85,32%, c) 86,5%, d) 90,7%; im Mittel 85,5%.

[1]) Kunz, R., Zeitschr. d. österr. Apothekervereins **39**, 186—189, ref. Chem. Centralblatt **1**, 791. 1901.

[2]) E. Jungfleisch und Godchot, M., Compt. rend. de l'Acad. des Sc. **140**, 502; **141**, 111; **142**, 515; ref. Chem. Centralblatt 1905, **1**, 861; **2**, 542.

3. Drei Proben derselben Lösung zu je 20 ccm (unter Anrechnung des Anhydridgehaltes 0,20 g Milchsäure enthaltend) wurden zum Zwecke der Aufspaltung des Anhydrids eine Viertelstunde lang mit 40 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH am Wasserbade erwärmt und sodann erst der Bestimmung nach Fürth-Charnass-Embden unterworfen. Es wurden gefunden statt 0,20 g Milchsäure:

a) 0,1965 g Milchsäure	= 98,2%		
b) 0,179 g „	= 89,1%	Mittel: 92,4%	
c) 0,180 g „	= 90,0%		

4. 40 ccm der Milchsäurelösung (unter Anrechnung des Anhydridgehaltes 0,40 g Milchsäure enthaltend) wurden mit 60 ccm Rinderblutplasma versetzt; das Gemenge wurde mit Ammonsulfat gesättigt, aufgekocht, heiß filtriert, der Niederschlag noch einmal mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgekocht. Die Milchsäurebestimmung ergab 0,3415 g Milchsäure, was (unter Vernachlässigung der im Serum enthaltenen Milchsäure) einer Ausbeute von 85,4% entspricht.

5. Proben der anhydridhaltigen Milchsäurelösung wurden nach der Vorschrift von Ohlson ausgeschüttet und die Extrakte sodann der Bestimmung nach Fürth-Charnass-Embden zugeführt:

a) verwendete Menge (unter Einrechnung des in Form von Anhydrid vorhandenen Anteils)	0,20 g Milchs.,	gef. 0,1454 g Milchs.	= 72,7%	Mittel: 70,8%
b)	0,20 g „	„ 0,1386 g „	= 69,3%	
c)	0,40 g „	„ 0,2818 g „	= 70,4%	

Es sind also nicht einmal $^{3}/_{4}$ der vorhandenen Milchsäuremenge wiedergefunden worden. Wo ist die in Verlust gegangene Milchsäuremenge geblieben?

In der wässerigen, bereits ausgeschüttelten Portion, welche von rechtswegen nunmehr frei von Milchsäure sein sollte, fand sich nach Beseitigung des darin gelösten Amylalkohols durch Benzol noch 1,7% der Milchsäure; also immerhin nur ein kleiner Anteil. Die Hauptmenge ist offenbar auch nach Ausschüttelung mit Na_2CO_3-Lösung im Amylalkohol verblieben. Es wird uns dies dann verständlich, wenn wir annehmen, daß es sich hier um ein Lactid gehandelt habe, das kein freies Carboxyl enthalten hat, daher auch beim Ausschütteln nicht in die Sodalösung überzugehen vermochte.

Zusammenfassend werden wir sagen können, daß in Milchsäurelösungen, die Anhydride enthalten, die direkte Titration selbstverständlicherweise zu kleine Werte gibt. Jedoch auch die direkte Bestimmung nach dem Aldehydverfahren kann etwas zu kleine Werte geben. Es scheint, daß eben in den Anhydriden der Milchsäure die oxydative Aldehydabspaltung nicht so glatt verläuft wie in freier Milchsäure. Beim Ausschüttelungsverfahren nach Ohlson kann ein Anhydridgehalt der Milchsäure recht erhebliche Fehler bedingen[1]).

[1]) Auch Ohlson hat bemerkt, daß die Ausschüttelung der Milchsäure durch Anhydridbildung erschwert werde.

Es wird sich also überall dort, wo der Verdacht auf Anhydridgehalt einer milchsauren Lösung vorliegt — also z. B. bei Untersuchungen von Fabrikpräparaten, von milchsäurehaltigen Gärungsgemischen, von lange Zeit aufbewahrten Organextrakten u. dgl. — immerhin empfehlen, eine Parallelprobe durch Zusatz von Natronlauge auf einen Gehalt von $^{n}/_{10}$-NaOH zu bringen, eine Viertelstunde am Wasserbade zu erwärmen und sodann die Milchsäurebestimmung zu wiederholen, um in dieser Weise die durch den Anhydridgehalt etwa bedingten Fehler auszuschalten.

Zusammenfassung.

1. Die Ausschüttelung der Milchsäure mittels Amylalkohol nach dem Vorgange von Ohlson führt bei reinen, wässerigen Milchsäurelösungen, nicht aber bei eiweißhaltigen Lösungen zu befriedigenden Ergebnissen. Die auszuschüttelnde Flüssigkeit muß völlig eiweißfrei sein. Diese Bedingung kann bei der Verarbeitung von Muskelextrakten am zweckmäßigsten durch Phosphorwolframsäurefällung erfüllt werden. Die von Ohlson empfohlene Sättigung der zu extrahierenden Flüssigkeit mit Ammonsulfat hat sich als weniger praktisch erwiesen.

2. Ein Bruchteil der in einem Organ vorhandenen Milchsäure verbleibt zwar beim Auskochen im Koagulum. Die Größe dieses Bruchteiles ist jedoch seinerzeit von Mondschein infolge eines Mangels in seiner Methodik wesentlich überschätzt worden. Die Menge der im Eiweißkoagulum zurückbleibenden und daraus durch ein Aufschließungsverfahren erhältlichen Milchsäure tritt im allgemeinen gegenüber dem in den Kochextrakt übergehenden Hauptquantum so weit in den Hintergrund, daß es für die Mehrzahl physiologischer Untersuchungen in praxi genügen dürfte, sich auf die Bestimmung im Kochextrakte zu beschränken.

3. Zur annähernden Ermittlung des Milchsäurebildungsmaximums eines Organes empfiehlt es sich, den Organbrei, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, im Brutofen einer etwa 3tägigen Autolyse unter Zusatz von Toluol und Chloroform zu überlassen, um das Lactacidogen zum mindesten seiner Hauptmenge nach in Milchsäure überzuführen. Autolyse in 2 proz. Natriumbicarbonatlösung vermag zwar unter Umständen die Milchsäurebildung zu beschleunigen, birgt aber die Gefahr der Überlagerung einer sekundären Milchsäurezerstörung in sich.

4. Es besteht keine einfache Proportionalität zwischen dem Milchsäurebildungsvermögen verschiedener Organe desselben Individuums und ihrem Gesamtkohlenhydratbestande.

5. Infolge der Anhydridbildung in Milchsäurelösungen gibt nicht nur die einfache titrimetrische Bestimmung, sondern auch das Aldehydverfahren zu kleine Werte. Beim Ausschüttelungsverfahren nach Ohlson kann ein Anhydridgehalt recht erhebliche Fehler bedingen. Bei Untersuchung von käuflichen Milchsäurepräparaten, Gärungsgemischen u. dgl. wird es sich empfehlen, durch $^1/_4$stündiges Erwärmen einer Parallelprobe bei einem Gehalte von $^n/_{10}$-Natronlauge auf dem Wasserbade das Anhydrid zur Aufspaltung zu bringen und die Milchsäurebestimmung sodann zu wiederholen.

Über die chemischen Eigenschaften von Nahrungsfetten verschiedener biologischer Wertigkeit.

Von

S. Rosenbaum.

(Aus der Universitätskinderklinik Breslau.)

(*Eingegangen am 1. Juli 1920.*)

Systematische Ernährungsversuche haben gezeigt, daß die Nahrungsfette für den Organismus nicht nur als Brennstoffe Bedeutung haben, sondern daß sie auch bestimmte Bestandteile enthalten müssen, welche der Organismus auf die Dauer nicht entbehren kann [Stepp[1], [2]), Aron[4])]. Aber nicht alle Nahrungsfette sind in dieser Beziehung gleichwertig. Tiere, die als Nahrungsfett lediglich Olivenöl, Margarine oder Schweineschmalz erhalten, leben nicht länger als solche, an die Fett überhaupt nicht verfüttert wird. Erst Zusatz ganz bestimmter, „biologisch hochwertiger" Fette erhält bei sonst quantitativ ausreichender Nahrung Tiere dauernd am Leben.

Die Bestimmung des biologischen Wertes verschiedener Fette haben sich mehrere Autoren zur Aufgabe gesetzt.

Osborne und Mendel konnten im Ernährungsversuch bei einer Grundnahrung, die allerdings nicht durchweg aus „reinen" Stoffen zusammengesetzt war, Butterfett, Eigelbfett und Lebertran als Träger wirksamer Ergänzungsstoffe ermitteln, während Zulagen von Schweinefett, Olivenöl oder Mandelöl nicht imstande waren, die kalorisch ausreichende, aber biologisch unzureichende Grundnahrung lebenerhaltend zu ergänzen. Halliburton und Drumond[3]) fanden vegetabilische Margarine und Schmalz als „Defektstoffe", stellten hingegen Oleo-Margarine und Rinderfett der Butter gleich.

---

[1]) Stepp, Ergebnisse der Inn. Med. u. Kinderheilk. Bd. **15**. Hier auch die Literatur, soweit sie nicht in Fußnoten angegeben.

[2]) Stepp, Med. Klin. **29**.

[3]) Halliburton, W. D., u. Drumond, J. C., Journ. of physiol. **51**, Nr. 5235.

[4]) Aron, Monatsschr. f. Kinderheilk. **15**, 568. Diese Zeitschr. **92**, 223.

Bei einer aus „reinen Stoffen“ zusammengesetzten Grundnahrung vermochte Stepp mit Butterfett keine Wirkung zu erzielen, und konnten Mc Collum und M. Davis Olivenöl, Schweinefett, Butter-Ätherextrakt als wirksam, als noch wirksamer Eigelbätherextrakt, ätherunlösliches Butterfett dagegen als unwirksam erkennen.

Mac Arthur und Luckett fanden Olivenöl, Butter und Lecithin wirkungslos, konnten in dem wirksamen Eigelbextrakt andrerseits aber zwei Anteile unterscheiden, von denen der eine — der aus einem Alkoholextrakt gewonnene Ätherextrakt, enthaltend Kephalin, Lecithin, Fette und Cholesterin — sich als unwirksam erwies. Aron[1]) hat in ausgedehnten systematischen Fütterungsversuchen eingehend die „biologische Wertigkeit“ der einzelnen Nahrungsfette bestimmt. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen haben sich als hochwertig Butterfett, Eigelbfett, Lebertran, Nierenfette und andre tierische Organfette erwiesen, als völlig minderwertig Olivenöl, Schweineschmalz, pflanzliche Margarine. Rüböl und Rinderfett scheinen eine Mittelstellung einzunehmen.

Auf welchen Unterschieden in der Zusammensetzung diese grundlegende Verschiedenheit in der biologischen Wirksamkeit beruht, das festzusetzen ist bisher noch nicht gelungen. Gerade dies aber erschien für die weitere Bearbeitung der Frage von Wichtigkeit, und es ergab sich daher die Aufgabe, nach chemisch charakterisierbaren Unterschieden zwischen den einzelnen Nahrungsfetten zu fahnden, um auf diese Differenzen dann die verschiedene biologische Wertigkeit zurückführen zu können. Deshalb wurden in Ergänzung der von Aron unternommenen Fütterungsversuche gleiche Fette chemisch untersucht. Besonders wichtig erschien es, auch das Frauenmilchfett einzubeziehen, für dessen hohe biologische Bedeutung klinische Beobachtungen sprechen.

Daß die Unterschiede im verseifbaren Fettanteil, den Glycerinestern verschiedener Fettsäuren, liegen, war zunächst nicht wahrscheinlich. Aussichtsreicher erschien es, diejenigen Begleitstoffe der eigentlichen Fette zu untersuchen, die im Gegensatz zu dem verseifbaren Fett als unverseifbarer Anteil der Nahrungsfette zusammengefaßt und als „Lipoide“ bezeichnet werden. In der Tat scheinen vor allem zwei wohlcharakterisierte Körper aus dieser Gruppe der Fettbegleitstoffe eine besondere Stellung einzunehmen: die Sterine und die Phosphatide.

Auf die Bedeutung des Cholesterins wies seine Fähigkeit, hämolytische Gifte zu binden [Pribram[2])] und seine Teilnahme

---

[1]) Aron, Monatsschr. f. Kinderheilk. 15, 568. Diese Zeitschr. 92, 223.

[2]) Pibram, Bioch. Zeitschr. 1, 422.

bei physiologischen und pathologischen Stoffwechselvorgängen des Organismus [Klinkert[1])]. Besonders bedeutsam erschien auch der Nachweis einer Cholesterinverarmung des Blutes und seiner Organe nach fortgesetzter fettarmer Kost bei Kriegsernährung (Stepp, Rosenthal[2])]. Auf die Phosphatide wies ihre hervorragende Beteiligung am Aufbau des Nervensystems. Es lag also nahe, in der Gruppe der Lipoide gerade nach diesen beiden Körpern zu fahnden.

Zur Beantwortung der Frage, ob einer von diesen beiden Stoffen den wirksamen Lipoidanteil darstelle, schien der geeignete Weg der zu sein, einzelne Fette, deren Wirksamkeit oder Unwirksamkeit im systematischen Ernährungsversuch bereits einigermaßen klar sich ergeben hatte, auf ihren Gehalt an Cholesterin und Lecithin zu untersuchen. Ist einer von diesen beiden Stoffen das wirksame Agens der Lipoidgruppe, so muß er in den biologisch hochwertigen Fetten entweder in bedeutend größerer Menge als in den biologisch unwirksamen Fetten vorhanden sein, oder es müssen sich qualitative Unterschiede ergeben.

Wie stellen sich also nun beide Stoffe in ihrem quantitativen Anteil am Aufbau der biologisch ausgeprobten Fette, und zeigen vielleicht die Sterine, deren chemische Charakterisierung eine völlige Gleichartigkeit nicht zu ergeben schien, eine Verschiedenheit in der Weise, daß sich ihre Scheidung in wohlcharakterisierte Sterine der wirksamen Fette einerseits und der unwirksamen Fette andererseits ermöglichen läßt? Das war die Fragestellung, zu deren Beantwortung eine Reihe allgemein-orientierender Versuche angestellt wurden.

Untersucht wurden Eigelbfett, Lebertran, Butterfett, Frauenmilchfett, Schweineschmalz; als Äquivalent des rein nicht erhältlichen Olivenöls wurde Haselnußöl gewählt; schließlich wurde auch noch für die Lecithinbestimmung eine Margarine der Margarinewerke Berolina, welche gleichzeitig auf ihre biologische Wertigkeit in Tierversuchen an Ratten studiert worden ist und sich im Gegensatz zu Butter, Lebertran und Eigelbfett als ausgesprochen minderwertiges Nahrungsfett erwiesen hat (Aron, Monatsschr. f. Kinderheilk. *15*, 568), in die Untersuchung einbezogen, und für die Cholesterinuntersuchung zum Vergleich

---

[1]) Klinkert, Berl. klin. Wochenschr. **13**. Bang, J., Diese Zeitschr. **91**.
[2]) Rosenthal, Deutsch. med. Wochenschr. 1919, S. 21.

ein aus Hautschuppen eines kindlichen Ekzems hergestelltes Sterin, welches Ricklin im Jahre 1914 im hiesigen Laboratorium untersucht hatte (unveröffentlichter Versuch).

I. Sterine.

Für die quantitative Bestimmung stehen zwei Methoden zur Wahl. Einmal die Herstellung des reinen Cholesterins aus dem Ätherextrakt der wässerigen Seifenlösungen nach Bömer[1]), die nach Ritter[2]) die erschöpfendste ist, zum anderen die Digitonidbindungsmethode nach Windaus[3]), die aus einer Seifenlösung einen wesentlich höheren Cholesteringehalt extrahiert, als die Methode von Bömer [Klostermann und Opitz[4])]. Von diesen Autoren liegen für fünf Fettsorten Cholesterinwerte nach der Bestimmung als Digitonidester vor.

Tabelle I.

Cholesteringehalt nach Klostermann und Opitz (angegeben in % des extrahierten Fettes).

	Margarine	Schweineschmalz amerikan.	Schweineschmalz deutsch	Butterfett	Lebertran	Menschenfett
Gesamtcholester.	0,108	0,122	0,0745	0,071	0,516	0,175
Freies Cholesterin	0,098	0,126	0,0735	0,075	0,272	0,185

Für unsere Zwecke ist der Gehalt an Gesamtcholesterin (freies Cholesterin + Ester) zu betrachten. Danach ist Butterfett mit Schweineschmalz und Margarine auf eine Stufe zu stellen. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Aron und der überragenden Mehrzahl der Autoren, bei denen Butter als hochwertiges Fett wirkte.

Aus äußeren Gründen (Fettmangel) konnte von uns eine Digitonidbestimmung nicht vorgenommen werden. Die Fette wurden teils nach Salkowski, teils nach Bömer verseift. Ein Unterschied in der Ergiebigkeit dieser Methoden zeigte sich nicht. Die Ausschüttelung geschah nach der Angabe Bömers und erfolgte vier mal. Der Ätherrückstand wurde nochmals verseift, und die Seifenlösung dreimal ausgeschüttelt. Der Rückstand wurde in heißem absoluten Alkohol aufgenommen und so lange umkrystallisiert, bis die Sterine durchweg rein weiß oder klar durchsichtig und einheitlich auskrystallisiert waren. Erst die Menge dieser „reinen Sterine" wurde gewogen.

---

1) Bömer, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1898.
2) Ritter, Zeitschr. f. phys. Chemie **34**, 5430.
3) Windaus, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 2558.
4) Klostermann und Opitz, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. 1914, S. 720.

Tabelle II.

Steringehalt (in % der Fette).

	Margarine	Schweine-schmalz	Haselnußöl	Butterfett	Eigelbfett	Lebertran	Frauenmilchfett	Ekzemschupp.
A Nach anderen Autoren	„Margarine“: 0,250–0,180[1]) „Oleomargarine“: 0,180–0,190[1])	0,100–0,280[1])	0,500[1])	0,810—0,510[1]) 0,200—0,220 „auskrystallisiert“[2]) 0,850 „maximal“[3]) 0,850 „auskrystallisiert“[3])	14,8 „2,15° des Eigelbs“[2]) 1,5[4]) 4,5[5])	„Dorschlebertran“ 0,880–0,400[1]) 0,540–7,880[1])	0,300—0,400 „im wesentlich. Cholesterin“[6])	
B Eigener Befund		0,040	0,040	0,069	1,49	0,140	0,120	11,500[7])

Die Werte der Reihe B (eigene Befunde) beziehen sich auf **auskrystallisiertes** Cholesterin.

Die aus den **König**schen Tabellen entnommenen Zahlen beziehen sich offenbar auf „Rohsterine“, ebenso wie die Angabe von **Arnold**. Die Angabe für Eigelbcholesterin von H. A. Klein, die sich auf auskrystallisiertes Cholesterin bezieht, ist auffallend hoch. Die Werte der Reihe B sind **Minimalwerte**, da beim fortgesetzten Waschen und Umkrystallisieren dauernd Krystalle in Verlust gingen, obwohl die nachträglich ausgefallenen Sterine wiederum gesammelt und der Hauptmenge zugeführt wurden. Immerhin stehen sie zueinander in etwa entsprechendem Verhältnis, und ein Vergleich mit den in Tabelle 1 angegebenen Werten der erschöpfenden Digitonidmethode zeigt, daß sie nicht allzu weit vom Maximalwert entfernt sein dürften. **Weitaus am cholesterinreichsten ist Eigelbfett, danach folgt Lebertran und Frauenmilchfett. Gering ist der Cholesteringehalt des Butterfettes, am geringsten der des Schweineschmalzes und des Haselnußöls.**

Daß demnach Cholesterin schlechtweg der wirksame Fettbestandteil nicht ist, geht aus den quantitativen Bestimmungen ebenso deutlich hervor, wie aus den Versuchen von **Aron**, **Robertson**[8]), **Mac Arthur** und **Luckett**, bei denen Cholesterin allein unwirksam war.

Die beiden biologisch minderwertigen Fette Haselnußöl und Schweineschmalz sind offenbar auch die cholesterinärmsten, aber auch

---

1) **König, J.**, Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. 4. Aufl.

2) **Klein, H. A.**, Diese Zeitschr. 29, 465: „2,15% des Eigelbs“.

3) **Magnus-Levy**, zit. nach **Klein**.

4) **Kitt**, zit. nach **König**.

5) **Bömer, A.**

6) **Arnold**, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr-. u. Genußm. S. 433. 1912.

7) Bestimmt als Digitonid.

8) **Robertson**, Journ. of Biolog. Chem. 27, 393.

Butter, ein biologisch hochwertiges Fett, zeigt einen geringen Cholesteringehalt, und die Unterschiede im Cholesteringehalt von Eigelbfett — Frauenmilchfett — Lebertran entsprechen nicht Unterschieden in der biologischen Wirksamkeit.

Bestehen also zwischen der Menge des Cholesterins in den einzelnen Nahrungsfetten und ihrer biologischen Wertigkeit keine direkten Beziehungen, so bleibt doch die Frage offen, ob vielleicht die einzelnen Cholesterine der verschiedenen Nahrungsfette in ihrer Beschaffenheit charakteristische Unterschiede erkennen lassen.

II. Beschaffenheit.

Zur Prüfung dieser Frage kamen mehrere Wege in Betracht. Einmal konnten die auf Oxydationsprodukten des Cholesterins beruhenden Farbreaktionen einen Unterschied ergeben. Dann konnten die Schmelzpunkte und optischen Eigenschaften der Cholesterine und ihrer Verbindungen bzw. die sonstige Beschaffenheit dieser Verbindungen Verschiedenheiten ergeben. Schließlich war auch auf die anderen Bestandteile des „Rohsterins“ das Augenmerk zu richten.

Geprüft wurden die Farbreaktionen nach Salkowski[1]), Liebermann-Burchard[2]), Neuberg und Rauchwanger[3]). Sämtliche Reaktionen zeigten sich als außerordentlich empfindlich. Die Reihenfolge der Farbenerscheinungen war jedoch nur durch die Mengen der angewandten Substanzen, nicht durch die Herkunft der Cholesterine bedingt. Ein weiteres Eingehen erübrigt sich.

Schwierigkeiten bereitete die Bestimmung der optischen Eigenschaften. Ein käufliches Cholesterin unbekannter Herkunft ergab in 3% ätherischer Lösung $[\alpha]_D^{18,5} = -29,92$, in 1% ätherischer Lösung $[\alpha]_D^{21,6} = -18,5$. Die entsprechenden Werte für Eigelbcholestein waren — 33,0 und — 24,9. In 3% Chloroformlösung ergab Eigelbcholesterin $[\alpha]_D^{17,0} = -51,0$. Es ergab sich aber die Mißhelligkeit, daß durch die Verdunstung des Lösungsmittels eine genaue Konzentration nicht zu erreichen war. Auch bei Chloroformlösung waren kleine Substanzverluste nicht zu vermeiden, so daß die Bestimmung der spezifischen Drehung als Unterscheidungsmerkmal für die verschiedenen Cholesterine wegen der Versuchsfehler unterlassen wurde.

Die Bestimmung des Schmelzpunktes der Cholesterine geschah nach sehr oft wiederholtem Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol bis zur Schmelzpunktgleichheit bei zwei aufeinanderfolgenden Krystallisationsprozessen. Beziehungen zur biologischen Wertigkeit ließen sich nicht ermitteln.

Zur weiteren Charakterisierung der Cholesterine wurden von komplexen Verbindungen die Acetate [Bömer[4])] und Dibromacetate [Windaus[5])] hergestellt. In der Art des Auskrystallisierens und in der

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **6**, 207.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **18**, 804.

[3]) Neuberg, C., Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 335.

[4]) Bömer, Zeitsch. f. Untersuch. d. Nahr.- u. Genußm. 1898.

[5]) Windaus, Chem.-Ztg. **30**, 1011.

Tabelle III.

Schmelzpunkte der Sterine.

Smp. (Korr.)	Margarine		Schweineschm.	Haselnußöl	Butterfett	Eigelbfett	Lebertran	Frauenmilchfett	Ekzemschupp.
A Nach König	149,3 bis 150,0 [1])	136,0—142,2 „Oleomargarine"	148,9 bis 150,7 [1])		148,4 bis 150,3 [1])	137 [2])	150,5 [1])		
B Eigener Befund			150,0	135,6	149,5	147,0	150,2	148,7	149,3

Krystallform ergab sich kein wesentlicher Unterschied. Auch die Schmelzpunkte der Verbindungen ergaben keine charakteristischen Differenzen, vorausgesetzt, daß die Bestimmung jedesmal bald nach der Krystallisation erfolgte. Beim Liegen an der Luft treten Oxydationsvorgänge und Schmelzpunktserniedrigungen ein [Schulze und Winterstein [3])]. Abgesehen von dem bekannten Unterschied zwischen Cholesterin und Phytosterin scheint es sich um gleichartige Verbindungen zu handeln, die lediglich durch geringgradige Verunreinigungen, die trotz des wiederholten Umkrystallisierens nicht zu entfernen sind, kleine Unterschiede im Schmelzpunkt zeigen.

Tabelle IV.

Verbindungen der Sterine

Smp. (Korr.)	Schweineschm.	Haselnußöl	Butterfett	Eigelbfett	Lebertran	Frauenmilchfett	Ekzemschupp.
Acetat	114,4	128,9	114,5	114,8	114,8	114,2	114,8
Dibromacetat . .	125,0	Krystalle fallen ohne Wasserzusatz nicht aus	124,4	124,3	124,5	123,8	124,4

Es bleibt zu erörtern, ob vielleicht andere Bestandteile des unverseifbaren Anteils Träger der biologischen Wirkung sind. Im Alkohol, aus dem die Sterine krystallisierten, zeigten sich bei allen Fetten mit Ausnahme des Lebertrans (und des Hautschuppenfettes) einige mehr oder weniger gelb gefärbte Tropfen eines klaren Öles, das bei Luftzutritt harzartig eintrocknete, aber alkohollöslich blieb. Weder das Vorkommen noch die Menge dieses Öls steht aber in irgendeiner Beziehung zur biologischen Wertigkeit.

III. Phosphatide.

Zu einer orientierenden Übersicht wurden die P_2O_5-Mengen im Eigelbalkoholextrakt, Frauenmilchfettätherextrakt, Lebertran und in der Margarine bestimmt.

[1]) König, J., Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. 4. Aufl.

[2]) Klein, H. A., Diese Zeitschr. 29, 265. „2,15% des Eigelbs."

[3]) Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chemie 43, 316.

Die Substanz wurde nach Neumann feucht verascht, Phosphor als Phosphorammoniummolybdat gefällt, die Phosphorsäure titrimetrisch, beim Eigelbfett gravimetrisch als Ammoniummagnesiumphosphat bestimmt.

Tabelle V.
P_2O_5-Gehalt der Fette.

	Margarine		Butterfett	Frauenmilchfett		Lebertran	Trockeneigelbalkoholextrakt	
A Gewichtsmengen zur Bestimmung	15,52	15,82	·	22,216	19,846	18,86 g	3,0205	3,0205
$^N/_{10}$-NaOH verbraucht	9,6	4,2		1,76	1,04			
P_2O_5 12%	0,0155	0,0063		0,0104	0,0084	nicht wägbar	1,494	1,421
B Andere Autoren			0,00687[1]	0,0117[1]		0,062[2]	0,568[3]	

Die gefundenen Werte für P_2O_5 sind, da es sich um Bestimmungen im Ätherextrakt handelt, den Phosphatidwerten proportional zu setzen, bis auf den Wert für Eigelbextrakt; hier ist die Bestimmung in einem Alkoholextrakt ohne nachfolgende Ätherextraktion vorgenommen worden, so daß hier der Übergang von Eiweißbestandteilen in den Extrakt nicht auszuschließen ist. Immerhin ergibt ein Vergleich mit dem von Juckenack gefundenen Werte, daß auf jeden Fall dem Eigelbfett der bei weitem höchste Gehalt an Phosphatiden zuzusprechen ist, so daß auch eine Proportionalität der biologischen Wertigkeit der untersuchten Fette mit ihrem Phosphatidgehalt nicht zu erkennen ist, wie auch die Ergebnisse der Ernährungsversuche von Mac Arthur und Luckett und von Aron ergeben, daß der Phosphatidgehalt, ebenso wie der Gehalt an Cholesterin nicht als Ursache der biologischen Wertigkeit der Fette betrachtet werden kann.

Zusammenfassung.

1. Zwischen dem Gehalt der untersuchten Nahrungsfette Eigelbfett, Lebertran, Butterfett, Frauenmilchfett, Schweineschmalz und Haselnußöl an Sterinen wie an Phosphatiden und der biologischen Wertigkeit dieser Nahrungsfette lassen sich bestimmte Beziehungen nicht nachweisen.

2. Die Sterine der Fette zeigen qualitativ keine wesentlichen Unterschiede, die mit der biologischen Wertigkeit in Beziehung zu bringen wären.

3. Die Untersuchung des unverseifbaren Anteils einer Reihe von Nahrungsfetten deutet bisher nicht darauf hin, daß die charakteristischen Unterschiede der biologischen Wertigkeit nur im „unverseifbaren Anteil" zu suchen sind.

[1]) Glikin, Diese Zeitschr. 21, 348.
[2]) Biegel, zit. nach König, 0,063–0,075% H_3PO_4.
[3]) Juckenack, zit. nach König, 0,823% H_3PO_4.

Über die Wirksamkeit der Fermente unter abnormen Bedingungen und über die angebliche Aldehydnatur der Enzyme.

Von

Elisabeth Rona.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 29. Juni 1920.)

Auf Grund des Umstandes, daß neben vielen anderen Stoffen die verschiedenen Reagentien auf Aldehydgruppen — wie Hydrazinbasen, Hydroxylamin und seine Abkömmlinge, Blausäure sowie schwefligsaure Salze — als starke Gifte auf das natürliche Protoplasma wirken, hat O. Loew im Jahre 1881 die Theorie aufgestellt, daß im sog. lebendigen Eiweiß Aldehydreste vorhanden wären, und hat diese Anschauung[1]) bis in die jüngste Zeit hinein vertreten, obgleich von mehreren Seiten dagegen Bedenken geltend gemacht worden sind. Während Loew für seine Ansicht eine Reihe wirklich vorhandener chemischer Erfahrungen anführen könnte — es sei an das Vorkommen von Kohlehydratkomplexen in einigen Proteinen sowie an den leichten Übergang der Aminosäuren in Aminoaldehyde[2]) erinnert —, ist die Behauptung der Aldehydstruktur auch auf die Fermente ausgedehnt worden, wie es scheint, ohne irgendwelche tatsächlichen Grundlagen. Zwar meint noch neuerdings Th. Bokorny[3]), daß Enzyme Eiweißkörper wären. In Wirklichkeit dürften die Verhältnisse so liegen, daß mindestens für eine größere Reihe von Fermenten der Eiweißcharakter außerordentlich unwahr-

---

[1]) O. Loew, B. **14**, 2508, 2589. 1881; **15**, 695, 2753. 1882; Chem.-Ztg. **44**, 417. 1920.

[2]) C. Neuberg, B. **41**, 956. 1908. — E. Fischer, ebendas. **41**, 1019. 1908.

[3]) Th. Bokorny, diese Zeitschr. **70**, 213. 1915; **100**, 100. 1919.

scheinlich ist und lediglich die schwierige Abtrennbarkeit von den Proteinen Jahrzehnte hindurch Anlaß gegeben hat, die Fermente selbst zu den Eiweißkörpern zu rechnen. Wie Ohta[1]) für das Emulsin, Willstätter und Stoll[2]) sowie Willstätter[3]) für die Peroxydase des Meerrettichs und für die Lipase, wie S. Fränkel, Hamburg und Pribram für die Diastase, wie Osborne und besonders v. Euler und Mitarbeiter für Invertase nachgewiesen haben, können die genannten Fermente eiweißfrei dargestellt werden, und jedenfalls darf man ihnen eine Aldehydfunktion[4]) nicht unter dem Gesichtspunkte einer allgemeinen Beziehung zum Eiweiß zuschreiben, für das ja selbst das Vorliegen der genannten Gruppen keineswegs feststeht. Es hat natürlich auch nichts mit der erwähnten Frage nach einem Aldehydcharakter der Fermente zu tun, wenn man bei ihnen auf Kohlehydrate in glucosidischer oder polysaccharidartiger Bindung stößt; denn bei diesen gerade sind freie Aldehydradicale nicht vorhanden, und etwa für die Annahme, daß das Ferment bei seiner Tätigkeit sich in seine Bausteine spalte und dann regeneriere, haben wir keinerlei Anhaltspunkte.

Es gab nun eine Versuchsanordnung, die Frage nach dem Aldehydcharakter der Fermente direkt experimentell zu prüfen, darin bestehend, daß man sie in Gegenwart notorischer Carbonylreagentien wirken ließ. Über diesen Gegenstand liegt, soweit mir bekannt, kein systematisches Material vor. Daher prüfte ich folgende 6 Fermente, die teils zu den Proteasen, teils zu den Glucosidasen zählen: Pepsin, Trypsin, Amylase, Emulsin, Invertase und Maltase, und zwar untersuchte ich die Tätigkeit:

des Pepsins in Gegenwart von Natriumbisulfit, Hydroxylamin und Benzolsulfhydroxamsäure,

des Trypsins in Gegenwart von Dinatriumsulfit, Cyankalium und Phenylhydrazin,

---

[1]) K. Ohta, diese Zeitschr. 58, 329. 1914.

[2]) R. Willstätter und A. Stoll, Ann. 416, 21. 1918.

[3]) R. Willstätter, Chem. Centralbl. 1919, IV, 59 u. 306.

[4]) Nach den übereinstimmenden Befunden von v. Kaufmann, Levite, Jacoby, Sallinger und Wohlgemuth ist die Wokersche Behauptung betreff seiner tiefer gehenden Ähnlichkeit der Wirkungen von Amylase und Formaldehyd auf Stärke als so abwegig gekennzeichnet worden, daß ich auf diesen Punkt nicht mehr einzugehen brauche.

der Amylase in Gegenwart von Dinatriumsulfit,

des Emulsins in Gegenwart von Natriumsulfit und Kaliumcyanid,

der Invertase in Gegenwart von Phenylhydrazin sowie

der Maltase in Gegenwart von Natriumsulfit.

Von den erwähnten Fermenten kamen verschiedene Präparate zur Anwendung.

Bereits aus den Untersuchungen von C. Neuberg mit E. Färber und E. Reinfurth über die Gärungserscheinungen ging klar hervor, daß sowohl Invertase als Zymase und Carboxylase in Anwesenheit verschiedener schwefligsaurer Salze[1]) sowie eines anderen spezifischen Aldehydreagenzes, des Dimedons[2]), außerordentlich gut wirken, und daß auch die Maltase aktiv bleibt; für die Gruppe der dem Emulsin verwandten cyanogenen β-Glucosidasen ist die Tätigkeit in blausäurehaltiger Umgebung eine alte Erfahrung.

Meine im nachstehenden mitgeteilten Ergebnisse lehren, daß ganz allgemein die Enzyme in Gegenwart der typischen Reagentien auf Aldehydgruppen hydrolysierten, sofern man — wenigstens bei den empfindlicheren Fermenten — für die Herstellung einer bestimmten H-Ionenkonzentration sorgte.

Der etwaige Einwand, daß die Enzyme trotz ihrer Aldehydstruktur in Gegenwart der Carbonylreaktive in Wirksamkeit träten, weil die Verbindung zwischen Ferment und zugefügtem Aldehydreagens einer Dissoziation unterliegen könnte, ist deshalb zurückzuweisen, weil die Menge des eine Aldehydgruppe bindenden Zusatzes im Vergleich zum vorhandenen Fermentquantum sehr groß ist. Wenn beispielsweise auf 0,4 g käufliches Trypsinpulver, das sicherlich nicht den hundertsten Teil wirkliches Ferment enthält, 2 ccm reines Phenylhydrazin oder 2 g Cyankalium treffen, wenn bei 1 g Handelsemulsin von vornherein 1 g KCN vorhanden ist, oder auf 1 g frische Hefe mit rund 0,2 Trockensubstanz die fünfeinhalbfache Menge Phenylhydrazin kommt, so handelt es sich praktisch wohl um unendlich

---

[1]) C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238. 1916; C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234. 1918; 105, 307. 1920; B. 52, 1677. 1919; 53, 1039. 1920.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 106, 281. 1920.

große Mengen von Carbonylreagens im Vergleich zum Enzym. Da aber trotz dieses hohen Zusatzes die Fermente nicht nur qualitativ unverändert arbeiten, sondern auch bei richtig reguliertem Milieu in quantitativer Hinsicht nur unwesentlich oder gar nicht geschwächt werden, so kann man darin ein starkes Beweismittel gegen die Annahme sehen, daß die Fermente auf Grund eines Gehalts an aktiven Aldehydgruppen ihre Tätigkeit entfalten.

Versuche.

Um nach Möglichkeit polarimetrisch[1]) die Einwirkung der Fermente verfolgen zu können, wählte ich in Wasser lösliche Stoffe als Substrate. Verschieden konzentrierte Auflösungen derselben wurden mit den Aldehydreagenzien und mit so viel verdünnter Säure, Lauge oder Puffergemisch versetzt, daß die Reaktion angenähert optimal war. Überall wurden die Reihen im Brutschrank bei 37° digeriert.

I. Pepsin.

A. Pepsin mit Natriumbisulfit.

α) 100 ccm einer 5 proz. Lösung von Witte-Pepton wurden mit 1 g Pepsin (Witte), 1 g festen Dinatriumsulfit und 1 ccm Salzsäure von 27% sowie mit 1 ccm Toluol als Antisepticum versetzt.

β) Zur Kontrolle wurden 100 ccm der gleichen 5 proz. Peptonlösung mit 1 g Pepsin und mit je 1 ccm Wasser, Salzsäure und Toluol zusammengebracht.

γ) Eine weitere Gegenprobe bestand darin, daß zu 100 ccm 5 proz. Peptonlösung 1 g Dinatriumsulfit, je 1 ccm Wasser, Salzsäure und Toluol, aber kein Ferment gefügt wurde.

Die Drehungen werden in klar filtrierten Proben nach den angegebenen Zeiten im 1-dcm-Rohr an dem Prozente Traubenzucker anzeigenden Präzisionsapparat von Neuberg abgelesen.

Tabelle I.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−2,95	−3,0	−3,0
27,5	−2,3	−2,45	−3,0
48	−2,25	−2,3	−3,0

[1]) Den im folgenden angeführten Drehungswerten kommt nur angenäherte Genauigkeit zu, da die Möglichkeit besteht, daß die angewandten Reagenzien mit den Produkten der fermentativen Spaltung unter Wasseraustritt, durch Addition oder Komplexbildung reagieren.

Man sieht, daß das in Lösung vorhandene Natriumbisulfit, eines der bekanntesten und besten Aldehydbindungsmittel, keinen deutlichen Einfluß auf die Spaltung von Pepton durch Pepsin ausübte.

B. Pepsin mit Hydroxylaminchlorhydrat.

α) Zu 100 ccm einer etwa 10 proz. Peptonlösung wurden 1 g Pepsin, 1 g Hydroxylaminchlorhydrat, 1 ccm Salzsäure (27 proz.) und 1 ccm Toluol gefügt.

β) 100 ccm derselben Peptonlösung wurden mit 1 g Pepsin, 1 ccm 27 proz. Salzsäure, 1 ccm Wasser und 1 ccm Toluol versetzt.

γ) 100 ccm 10 proz. Peptonlösung wurden mit 1 g Hydroxylaminchlorhydrat, 1 ccm Salzsäure und 1 ccm Toluol vermischt.

Tabelle II.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−5,05	−5,0	−5,2
22	−4,4	−4,55	−5,2
46	−4,15	—	−5,15
74	−3,9	−3,9	−5,2
96	−3,8	−3,9	−5,1

Salzsaures Hydroxylamin verhinderte also die peptische Verdauung nicht.

C. Pepsin mit Benzolsulfhydroxamsäure.

α) 100 ccm einer 3 proz. Peptonlösung wurden mit 1 g Pepsin, 0,5 ccm 27 proz. Salzsäure, 1 g Benzolsulfhydroxamsäure und 1 ccm Toluol versetzt.

β) 100 ccm derselben Peptonlösung mit 1 g Pepsin, 0,5 ccm 27 proz. Salzsäure, 1 ccm Wasser sowie 1 ccm Toluol.

γ) 100 ccm derselben Peptonlösung mit 1 g Benzolsulfhydroxamsäure, 0,5 ccm 27 proz. Salzsäure, 1 ccm Wasser und 1 ccm Toluol.

Tabelle III.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−1,5	−1,5	−1,4
25	−1,05	−1,1	−1,4
50	−1,0	−1,1	−1,35
78	−1,0	−0,95	−1,4

Da auch die Benzsulfhydroxamsäure nicht hemmte, so hat sich in allen Proben mit Pepsin gezeigt, daß die Verdauung in Anwesenheit der Carbonylreagentien praktisch ebenso gut wie ohne diese vonstatten ging, während in Abwesenheit von Ferment diese Zusätze an sich natürlich keinen Abbau der Eiweißsubstanz zuwege brachten.

II. Trypsin.

A. Trypsin mit Dinatriumsulfit.

α) 100 ccm einer 5proz. Peptonlösung sind mit 0,4 g Trypsin (Witte), 1 g festem Dinatriumsulfit, 0,5 ccm halbgesättigter Sodalösung und 1 ccm Toluol versetzt worden.

β) Zu 100 ccm derselben Peptonlösung wurden 0,4 g Trypsin, 1 ccm Wasser, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung sowie 1 ccm Toluol gegeben.

γ) In der Kontrollprobe wurden zu 100 ccm der Peptonlösung 0,4 ccm Wasser, 1 g Dinatriumsulfit und 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 ccm Toluol gefügt.

Tabelle IV.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−2,5	−2,4	−2,6
24	−1,5	−1,25	−2,6
42,5	−1,3	−1,2	−2,6

Dinatriumsulfit beeinflußte somit die tryptische Spaltung nicht wesentlich.

B. Trypsin mit Cyankalium.

α) 100 ccm 10proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 1 g Cyankalium, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 ccm Toluol.

β) 100 ccm 10 proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 1 ccm Wasser, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 ccm Toluol.

γ) 100 ccm 10proz. Peptonlösung, 1 g Cyankalium, 0,4 ccm Wasser, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 ccm Toluol.

Tabelle V.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−4,9	−4,95	−5,0
22	−2,7	−2,65	−5,1
49	−2,5	−2,6	−5,1

C. Trypsin mit verdoppelter Cyankaliummenge.

α) 100 ccm einer 5 proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 2 g Cyankalium, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 ccm Toluol.

β) 100 ccm der gleichen Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 2 ccm Wasser, 0,5 g halbgesättigte Sodalösung sowie 1 ccm Toluol.

γ) 100 ccm derselben Peptonlösung, 2 g Cyankalium, 0,5 ccm halbgesättigte Sodalösung, 0,4 ccm Wasser und 1 ccm Toluol.

Tabelle VI.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−2,4	−2,4	−2,45
19	−1,8	−1,25	−2,4
42	−1,7	−1,2	−2,4

Während die kleinere Cyankaliummenge ohne sichtbaren Einfluß war, verzögerte die größere den Verdauungsvorgang ein wenig, hob ihn jedoch nicht im entferntesten auf.

D. Trypsin mit Phenylhydrazin.

α) 100 ccm einer etwa 5 proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 1 ccm reinstes Phenylhydrazin, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung und als Antisepticum 1 g Natriumfluorid.

β) 100 ccm der Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 1 ccm Wasser, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung sowie 1 g Natriumfluorid.

γ) 100 ccm gleiche Peptonlösung, 1 ccm Phenylhydrazin, 0,4 ccm Wasser, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung nebst 1 g Fluornatrium.

Tabelle VII.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−2,4	−2,25	−2,3
27	−0,65	−1,0	−2,4
72	−0,8	−1,0	−2,4

E. Trypsin mit mehr Phenylhydrazin.

α) 100 ccm einer rund 5 proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 2 ccm Phenylhydrazin, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung und 1 g Natriumfluorid.

β) 100 ccm 5 proz. Peptonlösung, 0,4 g Trypsin, 2 ccm Wasser, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung sowie 1 g Natriumfluorid.

γ) 100 ccm 5 proz. Peptonlösung, 2 ccm Phenylhydrazin, 0,4 ccm Wasser, 1 ccm halbgesättigte Sodalösung nebst 1 g Natriumfluorid.

Tabelle VIII.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−2,7	−2,45	−2,7
20	−1,8	−1,6	−2,5
68	−1,5	−1,3	−2,5
92	−1,4	−1,25	−2,55

Der tryptische Abbau der im Witte-Pepton vorliegenden Mischung von Albumosen und Peptonen wurde also durch das spezifische Aldehydreagens Phenylhydrazin nicht gestört.

III. Amylase.

Amylase mit Dinatriumsulfit.

In diesen Versuchen wurde die hydrolysierende Wirkung der Amylase nicht polarimetrisch, sondern titrimetrisch verfolgt, und zwar nach der Methode von Fehling. In der Tabelle ist angegeben, wieviel Kubikzentimeter des bebrüteten Stärkegemisches zur Reduktion von 20 ccm unverdünnter Fehlingscher Mischung verbraucht worden sind.

α) 100 ccm 2proz. Stärkelösung, 0,5 g Amylase (Diastase von Kahlbaum), 1 g Dinatriumsulfit und 1 ccm Toluol.

β) 100 ccm 2proz. Stärkelösung, 0,5 g Amylase, 1 ccm Wasser nebst 1 ccm Toluol.

γ) 100 ccm 2proz. Stärkelösung, 1 g Dinatriumsulfit, 0,5 ccm Wasser sowie 1 ccm Toluol.

Tabelle IX.

Zeit in Stunden	Zur Reduktion erforderliche ccm Versuchsgemisch		
	α	β	γ
0	Spuren	Spuren	Spuren
23	10,7	10,75	"
49,5	10,75	10,65	"

Das stärkespaltende Ferment wurde somit durch Natriumsulfit, das sich mit Aldehyden leicht vereinigt, nicht erkennbar beeinflußt.

IV. Emulsin.

Bei Emulsin[1]) sind die Wirkungsbedingungen enger begrenzt als bei den anderen Enzymen; so betätigen sich nach den

[1]) E. Fischer, B. 52, 199. 1919.

Feststellungen von Neuberg und Mitarbeitern Invertase, Zymase und Carboxylase sowohl bei alkalischer als saurer wie neutraler Reaktion des Mediums. Beim Emulsin habe ich in einigen Fällen, um die geeigneten Wasserstoff-Ionenkonzentrationen ($p_H = 5{,}2$) herzustellen, ein Puffergemisch benutzt.

A. Emulsin mit Dinatriumsulfit.

α) 100 ccm 5 proz. Amygdalinlösung, 0,5 g Emulsin (Kahlbaum), 1 g Dinatriumsulfit und 1 ccm Toluol.

β) 100 ccm 5 proz. Amygdalinlösung, 0,5 g Emulsin, 1 ccm Wasser und 1 ccm Toluol.

γ) 100 ccm 5 proz. Amygdalinlösung, 1 g Dinatriumsulfit, 0,5 ccm Wasser nebst 1 ccm Toluol.

Tabelle X.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−1,5[1]	−1,2[1]	−1,7
28,5	+0,5	+1,1	−1,7
48	−0,4	+1,15	−2,0[2]

Emulsin wirkte bei Gegenwart von schwefligsaurem Natrium trotz der falschen H-Ionenkonzentration, wenn auch wohl unvollständiger, auf Amygdalin.

B. Emulsin mit Cyankalium.

Bei diesen Versuchen wurde ein Puffer angewendet; ferner wurde, um die Mutarotation zu beseitigen, jeweils zu der klar filtrierten Flüssigkeit eine 3 proz. Sublimatlösung[3]) gegeben, und zwar eine Menge von 2 ccm auf 10 ccm Filtrat.

α) 50 ccm 2 proz. Salicinlösung, 1 g Emulsin (Merck), 1 g Cyankalium und ein Puffergemisch[3]), bestehend aus 25 ccm Citratlösung und 25 ccm 0,1-n-HCl, ferner 0,5 ccm Toluol.

[1]) Bei den Ferment enthaltenden Ansätzen sank der Drehungswert sofort nach erfolgter Mischung, denn das Emulsin wirkte schon bei Zimmertemperatur kräftig.

[2]) Worauf das Ansteigen der Drehung in der Kontrolle beruht, bleibt ungewiß; vermutlich handelt es sich um einen Einfluß von OH-Ionen, die nach Krieble (Journ. of the amer. chem. Soc. **34**, 716) schon in Spuren eine in ihrem Wesen nach nicht ganz geklärte Drehungssteigerung des Amygdalins hervorrufen; auch seine Umwandlung durch Basen in Isoamygdalin geht nach Dakin (Journ. chem. Soc. **85**, 1512) mit einer Erhöhung der Linksablenkung einher.

[3]) Soerensen, diese Zeitschr. **21**, 176 u. 260. 1909.

β) 50 ccm 2 proz. Salicinlösung, 1 g Emulsin, 1 ccm Wasser, 50 ccm Puffergemisch, enthaltend 40 ccm Citratmischung und 10 ccm 0,1-n HCl, sowie 0,5 ccm Toluol.

γ) 50 ccm 2 proz. Salicinlösung, 1 g KCN, 1 ccm Wasser und 50 ccm Puffergemisch wie bei α) nebst 0,5 ccm Toluol.

Tabelle XI.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	−1,4	−1,3	−1,35
20,5	+0,2	+0,5	−1,3
72	+0,3	+0,5	−1,3

Bei Zugabe von Cyankalium nebst Puffer spaltete Emulsin das angewendete Glucosid (Salicin).

V. Invertase.

Invertase mit Phenylhydrazin.

α) 100 ccm etwa 10 proz. Rohrzuckerlösung, 1 g obergärige Hefe M, 1,0 ccm Phenylhydrazin und 0,5 g Natriumfluorid.

β) 100 ccm derselben Rohrzuckerlösung, 1 g Hefe, 1,0 ccm Wasser sowie 0,5 g Natriumfluorid.

γ) 100 ccm jener Rohrzuckerlösung, 1,0 ccm Phenylhydrazin, 1 ccm Wasser und 0,5 g Natriumfluorid.

Tabelle XII.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	β	γ
0	+5,3	+5,3	+5,2
16	−1,55	−1,55	+5,25
40	−1,8	−1,75	+5,2
66	−1,85	−1,7	+5,25

Bei den Invertaseversuchen erfolgt natürlich eine allmähliche Bindung des Phenylhydrazins an die entstehenden Monosaccharide; die Drehungen sind daher bei den Ansätzen mit dieser Base nur ungefähr vergleichbar.

VI. Maltase.

Um bei Maltase, die ebenfalls ein empfindlicheres Ferment ist[1]), die optimale H-Ionenkonzentration herzustellen ($p_H = 6,1$ bis 6,8), habe ich die Reaktion reguliert.

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 57, 70. 1913.

Maltase mit Dinatriumsulfit.

α) 25 ccm 5 proz. Maltoselösung, 0,5 g untergärige Trockenhefe U, 0,5 g Dinatriumsulfit, 25 ccm Puffermischung, bestehend aus 17,5 ccm Citratmischung und 7,5 ccm 0,1 n-NaOH, sowie 1 ccm Toluol.

β) 25 ccm 5 proz. Maltoselösung, 0,5 g Trockenhefe, 0,5 ccm Wasser, 25 ccm Puffermischung, zusammengesetzt aus 13,7 ccm Citratgemisch und 11,3 ccm 0,1 n-NaOH, dazu 1 ccm Toluol.

γ) 25 ccm 5 proz. Maltoselösung, 0,5 g Dinatriumsulfit, 0,5 ccm Wasser, 25 ccm einer Puffermischung wie bei *α*) nebst 1 ccm Toluol.

Tabelle XIII.

Zeit in Stunden	Drehungen bei		
	α	*β*	*γ*
0	+3,1	+3,05	+3,15
22	+1,55	+1,7	+2,8
73	+1,35	+1,3	+2,75 [1])

Natriumsulfit war also ohne Einfluß auf die Maltasetätigkeit.

[1]) Der langsame und schwache Drehungsabfall in dem fermentfreien Ansatz kommt infolge Reaktion des Kohlenhydrats mit Sulfit zustande; die Verhältnisse entsprachen ganz den von Neuberg, Hirsch und Reinfurth, diese Zeitschr. **105**, 326, für Trauben- und Fruchtzucker beschriebenen.

Weitere Mitteilungen über chemisch definierte Katalysatoren der alkoholischen Gärung.

(Gärunfähige Zucker, Carbonylsäuren der Kohlenhydratreihe, aldehydische und ketonische Pflanzenbasen, Chinone und natürliche Farbstoffe, Nitro- und Nitrosokörper, Hydroxylaminderivate, organische und mineralische Disulfide, Polysulfide, Thio- und Selenosäuren, reduzierbare Metallsalze sowie Elemente.)

Von

Carl Neuberg und Marta Sandberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Bei dem eifrigen Studium, das der Vorgang der alkoholischen Gärung erfahren hat, sind eine Reihe positiver und negativer Katalysatoren für diesen Prozeß bekannt geworden. Das größere Interesse beanspruchen die ersteren, und unter ihnen bilden eine besondere Gruppe die chemisch charakterisierten und infolgedessen bis zu einem gewissen Grade in ihrer Wirkungsweise analysierbaren Aktivatoren. Über diese haben wir bisher folgendes festgestellt:

Die Beobachtung, daß ganz allgemein die α-Ketosäuren (die Brenztraubensäure-Homologen) als starke Beschleuniger des Gäraktes fungieren, selbst wenn sie nur in Spuren zugegen sind, hat den Anstoß zur Bearbeitung dieses Gebietes gegeben[1]). Da in Berührung mit lebenden Hefen oder Hefezubereitungen (Säften, Trocken- oder Dauerpräparaten) die α-Ketosäuren nicht von Bestand sind, sondern — wegen der Spaltung durch die Carboxylase — zu Kohlensäure und dem nächst niederen Aldehyd abgebaut werden, gelangten wir zu der Schlußfolgerung, daß regelmäßig auch die große Klasse der Aldehyde einen gärungsfördernden Einfluß entfalten müsse. Diese Voraussicht hat sich in vollem Umfange erfüllt. Wir haben früher gezeigt, daß die Aldehyde aller Reihen, d. h. aliphatische, aromatische wie fettaromatische, cyclische wie heterocyclische, natürliche und synthetische, einfache und beliebig substituierte, solche von niederen und höchsten Molekular-

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **71**, 75. 1915, sowie C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. **71**, 135. 1915.

gewichten und mit großer Wasserlöslichkeit wie mit lipotropem Charakter, grundsätzlich den gleichen Stimulationseffekt ausüben, und zwar in einer sehr variablen Konzentrationsbreite, indem die Verdünnungen zwischen m- und $^{m}/_{1000}$-Lösungen schwanken konnten. Dieses Verhalten war von uns an 71 Aldehyden festgestellt worden[1]).

Eine weitere Entwickelung erfuhr die Frage auf Grund der Erfahrung, daß die in biologischer Hinsicht gemeinsame Eigenschaft der Aldehyde ihre phytochemische Reduzierbarkeit ist. Die phytochemische Reduktion ist nun auch bei anderen Substanzgruppen möglich, so bei aliphatischen und aromatischen Nitrokörpern, bei Thioaldehyden und Disulfiden und ebenfalls bei anorganischen Salzen, wie beim unterschwefligsauren Natrium[2]). Aus zahlreichen Untersuchungen von Neuberg und seinen Mitarbeitern, die seit 1912 ausgeführt wurden, ergab sich, daß jenen Substanzen allgemein die Fähigkeit zukommt, als H-Empfänger zu dienen, und mit dieser Acceptortätigkeit geht, wie mehrfach hervorgehoben werden konnte, das Beschleunigungsvermögen vollkommen parallel. In der Tat war es möglich, diesen Zusammenhang für Vertreter aller dieser Gruppen darzutun, indem zunächst die Thioaldehyde, darauf die Ketone allerverschiedensten Baues, ferner Nitromethan, Nitrobenzol und o-Nitrotoluol sowie Äthyldisulfid, Cystin und Natriumthiosulfat als wirksame Stimulantien erkannt wurden[3]). Der Einfluß der genannten Katalysatoren erstreckt sich auf den Umsatz der 3 Zymohexosen; er ist am stärksten auf die Vergärung von Traubenzucker und Mannose.

Um weitere Anhaltspunkte für die Beurteilung der zugrunde liegenden Frage zu gewinnen, ob tatsächlich die durch Hefe reduzierbaren Körper in ihrer Ge-

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 88, 145. 1918, sowie C. Neuberg und M. Ehrlich, diese Zeitschr. 101, 239. 1920; dort auch die mit diesem Gebiete in Zusammenhang stehende Literatur.

[2]) Die Reduzierbarkeit von $Na_2S_2O_3$ durch Hefensaft allein ist von M. Hahn (Zymasegärung 1903, S. 342) entdeckt; bei gleichzeitig ablaufender Gärung entsteht neben H_2S nach Neuberg u. Welde (diese Zeitschr. 67, 111. 1914) Natriumsulfit, was Tanner (Journ. Amer. Chem. Soc. 40, 663. 1918) bestätigt hat.

[3]) C. Neuberg und M. Ehrlich, diese Zeitschr. 101, 276. 1920.

samtheit Aktivatoren der Gärung sind, haben wir noch eine größere Reihe von organischen und anorganischen Substanzen nach dieser Richtung hin geprüft.

Schon früher haben wir auf die merkwürdige, hier zuerst beobachtete Tatsache hingewiesen, daß selbst Zuckerarten, die an sich nicht gären, wie beispielsweise die Triosen, Pentosen, Methylpentosen, bestimmte Hexosen, Heptosen, die Lactose, das Glucosamin usw., einen Stimulationseffekt bei der Umsetzung gärbarer Kohlenhydrate äußern. Die allgemeine Gültigkeit dieser Erfahrung belegen wir mit zwei extremen neuen Beispielen, mit dem Glykolaldehyd, $C_2H_4O_2$, dem niedrigsten Zucker, sowie der Cellobiose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, dem bekannten Baustein der Cellulose. Wie aus den nachstehenden Tabellen (s. S. 301 u. 302) sich ergibt, gehört der Glykolaldehyd zu den allerstärksten Aktivatoren.

Andere natürlich vorkommende, an sich gärungsunfähige Substanzen aus der Zuckerreihe, die eine Carbonylgruppe enthalten, aktivieren ebenso den Gärungsvorgang, wie am Fall der d-Glucuronsäure ersichtlich ist. Ihr an schließt sich die auf synthetischem Wege erhaltene isomere d, l-Aldehydschleimsäure (Galakturonsäure) sowie die verwandte Keto-arabonsäure. Die Carbonylsäuren (die durch alle möglichen Oxydationen, auch durch Einwirkung von Licht und elektrischen Strömen nach den einschlägigen Untersuchungen Neubergs aus den Kohlenhydraten so leicht hervorgehen und wohl bei den biochemischen Vorgängen auftreten können), die zu ihnen gehörende Glucuronsäure, die häufig den Traubenzucker im Tierkörper begleitet, und die Galakturonsäure, deren d-Form nach F. Ehrlich sowie M. L. Suarez in Gestalt der Pektine und Saponine mit den gärfähigen Zuckern vielfach in den Vegetabilien vergesellschaftet ist, können also die alkoholische Zuckerspaltung erleichtern.

Bei einem Aldehyd der Alkaloidgruppe, dem Pelletierin, hatten wir vor Jahresfrist keine Wirkung festgestellt, aber schon damals darauf aufmerksam gemacht, daß uns kein reines Produkt zur Verfügung gestanden hatte. Mit einwandfreiem Pelletierin — sowohl mit der freien Base als mit ihrem bromwasserstoffsauren Salz — erhielten wir nunmehr den erwarteten Effekt. Damit ist die Zahl der als Gärungsaktivatoren

erkannten Aldehyde auf 76 gestiegen; ihre Menge scheint beliebig vermehrbar[1]).

Das dem Pelletierin isomere Keton, das Pseudopelletierin, erwies sich, da es eine Carbonylgruppe enthält, gleichfalls als Stimulans, und ebenso verhielten sich zwei weitere ketonische[2]) Pflanzenbasen, Hygrin und Cuskhygrin. Auch ein anderes, und zwar synthetisches Keton der Alkaloidreihe, nämlich der Chiningruppe, das Chininon, zeigte die Aktivierungsfähigkeit.

In den vorangegangenen Mitteilungen hatten wir bereits hervorgehoben — und die bisher neuerwähnten Substanzen bestätigen diesen Umstand —, daß es gerade wichtige Naturprodukte sind, die einen Einfluß auf den Ablauf der alkoholischen Gärung kraft ihres Beschleunigungsvermögens ausüben.

Dieselbe Eigenschaft findet sich nun verbreitet bei den vegetabilischen und animalischen Diketonen bzw. Chinonen. Für einfache Diketone, wie Diacetyl und Benzil, ferner für Campherchinon hatten wir schon den Stimulationseffekt beschrieben. In der Tat zeigen Isatin, Alizarin, Purpurin sowie Carminsäure, die nach den neusten Untersuchungen von O. Dimroth[3]) als ein Oxyantrachinonabkömmling zu betrachten ist, das Aktivierungsvermögen. Dementsprechend verhaltensichdiegewöhnliche β-Anthrachinon-monosulfosäure und ihr niedriges Homologon, die 1, 2-Naphthochinon-sulfosäure (-4), ferner das als Abbauprodukte wichtiger Alkaloide bedeutungsvolle Phenanthrenchinon nebst der 3-Phenanthrenchinon-sulfosäure und der natürliche Farbstoff Quercetin, der zur Gruppe der Flavonole gehört, ebenso. Dieser Zusammenhang von chemisch definierten ketonischen Pigmenten, insbesondere auch von den Blütenfarben, mit der Zuckerspaltung erscheint uns nicht gegenstandslos; eine beträchtliche Zahl der Pflanzenfarbstoffe enthält Carbonylgruppen.

Um weiteres Material für die gärungsfördernde Kraft der Stickstoff-Sauerstoffverbindungen zu erbringen, haben

---

[1]) Über ihr bemerkenswertes Vorkommen im Ackerboden s. Schreiner u. Skinner, Ch. C. 16. I. 520.

[2]) Vgl. R. Willstätter, B. 33, 1161. 1900.

[3]) O. Dimroth, A. 399, 1. 1913.

wir zunächst aus der aliphatischen Reihe das Nitroäthan mit dem erwarteten Resultat geprüft. Als ausgezeichnet wirksam erwiesen sich ferner die Nitrosokörper, so das Nitrosobenzol selbst, das p-Nitroso-dimethyl-anilin sowie Nitroso-β-naphthol. Auch die nächst niedere Reduktionsstufe, die im Phenylhydroxylamin vorliegt, zeigte katalysierende Fähigkeiten.

Erfolgreiche Versuche mit o-Nitrophenol, m-Nitranilin, m-Dinitrobenzol, α-oder [1:OH, 2, 4:]-Dinitrophenol sowie [1 CH_3, 2, 4, 6]-Trinitrotoluol, dem bekannten Sprengstoff Trilit, zeigten die allgemeine Verbreitung des Stimulationseffektes auch bei sehr verschiedenartigen komplizierteren und mehrfach substituierten Nitrokörpern. Vergleichende Ansätze mit äquimolekularen Mengen von Nitrobenzol, Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin ergaben, daß das Nitrosobenzol am kräftigsten den Gärakt beschleunigte. Die zymologische Zusammengehörigkeit dieser drei Körperklassen war nach ihrem gleichsinnigen Verhalten bei der phytochemischen Reduktion [Neuberg und Welde[1])] zu erwarten gewesen, wie ja überhaupt die Verbindungen mit diesen drei Radikalen nicht allein in vitro, sondern nach anderen Erfahrungen[2]) auch in mannigfachen biologischen Wechselbeziehungen stehen.

An den Beispielen des Äthyldisulfids, Cystins und $Na_2S_2O_3$ hatten wir früher die Rolle der aneinander geketteten Schwefelatome bereits erkannt. Das große Interesse, das gerade das Cystin als weitverbreitetes Eiweißspaltungsprodukt bietet, war uns Veranlassung, nicht nur die ehemals allein mit salzsaurem Cystin ausgeführten Versuche zu wiederholen, sondern sie auch auf Cystin in alkalischer Lösung, auf Cystin-natrium, auszudehnen. In beiden Formen wirkte dieses natürliche Disulfid[3]). Ihm nahe stehen die Dithiomilchsäure, $[-S \cdot CH(CH_3) \cdot COOH]_2$, sowie die Dithioglykolsäure,

[1]) C. Neuberg und E. Welde, diese Zeitschr. 60, 472 und 67, 18. 1914.

[2]) E. Meyer, H. 46, 503. 1905; W. Heubner, Arch. f. exper. Pathol. u. Therap. 72, 241. 1913; Moore, Med. Res. Comm. 1917; W. Lipschütz, H. 109, 221. 1920; vgl. auch R. Anschütz und W. Zimmermann, B. 48, 152. 1915 u. a. m.

[3]) Auf ein Freiwerden von „eingebautem" Cystin aus dem Hefeneiweiß infolge proteolytischer Vorgänge könnte u. a. die von uns früher gelegentlich beobachtete verstärkte Gärwirkung gelagerter Säfte zurückzuführen sein.

[—S · CH_2 · COOH]$_2$; beide betätigten sich als deutliche Aktivatoren. Da die Körper der Thioglykolsäurereihe leicht zugänglich sind, haben wir einen Vergleich zwischen dem Disulfid, Dithioglykolsäure, und dem betreffenden Mercaptan, der Thioglykolsäure [HS · CH_2 · COOH], sowie dem zugehörigen Sulfid, der Thiodiglykolsäure [S(CH_2 · COOH)$_2$], vorgenommen. Nur das Disulfid zeigte hier die Gärungsbeschleunigung und bestätigte die Richtigkeit unserer mehrfach hervorgehobenen Anschauung, daß die reduzierbare Gruppe den Aktivatoreffekt bedingt. Dasselbe Verhalten ergab die Gegenüberstellung von α-Dithiodilactylsäure und entsprechender α-Thiomilchsäure.

Durch das Ergebnis der letzterwähnten Versuche wurden wir dazu geführt, des weiteren einfache mineralische Schwefel- und Selenverbindungen zu prüfen, die in gewissem Sinne den organischen Disulfiden an die Seite zu stellen sind. Es scheint uns sehr bemerkenswert, daß das Natriumdisulfid, Na_2S_2, Natriumtrisulfid, Na_2S_3, sowie Natriumpentasulfid, Na_2S_5, deutlich aktivierten. Den gleichen Einfluß wies das Natriumtetrathionat, $Na_2S_4O_6$, auf.

Nach diesen Erfahrungen war es nicht erstaunlich, daß auch andere anorganische Substanzen Stimulatoren sind, in denen Schwefel in gebundener Form vorkommt. Es sind dies zunächst einfache Salze der in den Erzen so weit verbreiteten Thiosäuren, wie das Natriumsulfantimoniat, Na_3SbS_4, und Natrium sulfoxyarsenat, Na_3AsO_3S. Ähnlich verhielt sich das Natriumtrithiocarbonat, Na_2CS_3, sowie das Natriumselenosulfat, Na_2SSeO_3, und schließlich erzielten wir dasselbe Resultat einfach mit kolloidalem Schwefel sowie mit kolloidalem Selen; in diesen freien Metalloiden liegt ja nichts anderes vor als eine Aneinanderreihung von Schwefel- oder Selenatomen, nach E. Beckmann[1]) bis S_8 bzw. Se_8, die leicht zu den Wasserstoffverbindungen hydrierbar sind. Daß das zum Zerfall neigende Selencyannatrium, NaCNSe, wirksam ist, fügt sich ganz in den Rahmen der übrigen Beobachtungen. Das Kaliumxanthogenat, C_2H_5O · CSSK, beschleunigte gleichfalls nach einer anfänglichen Verzögerung, die mit irgendeiner Giftwirkung zusammenhängen dürfte.

[1]) E. Beckmann, Zeitschr. f. phys. Chem. **5**, 76. 1890; **22**, 614. 1897.

Die überraschende Tatsache, daß einfache anorganische Verbindungen wie die erwähnten schwefel- bzw. selenhaltigen Körper einen bedeutenden Einfluß auf den Vorgang der alkoholischen Zuckerspaltung ausüben können, veranlaßte uns zur Untersuchung noch anderer mineralischer Substanzen, insbesondere solcher Metallsalze, die in verschiedenen Oxydationsstufen auftreten können, namentlich der Verbindungen von Eisen, Kupfer, Zinn, Cer, Vanadin, Molybdän, Uran und Kobalt. Wir befanden als wirksam Ferrichlorid, Ferrisulfat, glycerinphosphorsaures Eisenoxyd, citronensaures Eisenoxyd-Ammoniak, Ferricyankalium, Kupfersulfat, Kupferchlorid, Glykokollkupfer, Cerichlorwasserstoffsäure, vanadinsaures Natrium, Kalium-hexasulfomolybdat, Uranylsulfat, Stanni-Ammoniumchlorid und komplexe Kobaltiverbindungen vom Typus Hexammin-kobalti-chlorid, Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat, Trinitrato-triammin-kobalt und Kalium-tetra-nitro-diammin-kobaltiat.

Einige der angeführten Verbindungen, wie das sulfoxyarsensaure Natrium $(NaO)_3As = S$, und K. A. Hofmanns hexasulfo-molybdänsaures Kalium, $K \cdot S_3 \cdot MoS_3$, gehören gleichzeitig zwei Kategorien an, indem sie sowohl Metall in einer desoxydablen Form als reduzierbaren Schwefel enthalten, der direkt oder mittelbar in einer polysulfidischen Bindung zugegen ist.

Kontrollversuche haben weiterhin gelehrt, daß die Salze derselben Metalle in niederer Oxydationsstufe, beispielsweise Ferro- und Kobaltoderivate, ganz im Einklange mit den an vergleichbaren organischen Stimulantien gemachten Erfahrungen, keinen beschleunigenden Einfluß besaßen.

In diesem Verhalten und überhaupt in der Wirksamkeit der so verschiedenartig konstitutierten Mineralstoffe liegt ein neuer Beweis[1]) für unsere Deutung, daß die Reduzierbarkeit und nicht eine physikalische Zustandsänderung mit dieser Art von gesteigerter CO_2-Entwicklung zusammenhängt. Die Desoxydation bedingt einen Verbrauch an Stimulans; ein solcher läßt sich, genau wie wir es früher für die organischen Aktivatoren gezeigt haben, ebenfalls für die anorganischen Salze

[1]) C. Neuberg u. M. Ehrlich, diese Zeitschr. 101, 280 u. 311. 1920.

nachweisen, sofern man eine sekundäre Belebung durch den Luftsauerstoff verhindert.

Daß nicht etwa lichtchemische Einflüsse mitspielen, an die man auf Grund der älteren Ergebnisse[1]) von Neuberg und seinen Mitarbeitern bei den Mineralsalzen und Chinonen hätte denken können, schließen besondere Dunkelversuche aus. Auch bei Fernhaltung von Strahlenarten kam die Gärungsförderung zustande, während unter dieser Bedingung erfahrungsgemäß eine photokatalytische Bildung von Carbonylsubstanzen aus Alkohol sowie Aminosäuren usw. unterbleibt.

Ersichtlicherweise handelt es sich bei den metallischen Gärungskatalysatoren teils um gewöhnliche, teils um komplexe Mineralstoffe, ferner um halb- und innerkomplexe Gebilde, also praktisch angenähert um alle vorkommenden Bindungsarten. Die Metallderivate weisen den 2., 3., 4., 5., 6. und 7. Wertigkeitsgrad[2]) auf. Es erscheint uns als ein schöner Erfolg der Theorie, daß die reduzierbaren Mineralstoffe in ihrer großen Mannigfaltigkeit sich dem allgemeinen Bilde einfügen, das wir von einem Zusammenhange zwischen Gärungsaktivierung und Desoxydation entwerfen konnten.

Bezüglich der disulfidischen, chinoiden und metallischen Fermentaktivatoren, die nach Zahl und Art bedeutender Variationen fähig sind, wird man ähnliche Betrachtungen anstellen dürfen, wie wir es vormals für die mit Beschleunigungsvermögen begabte Klasse der Aldehyde getan haben. Bedenkt man, daß auch auf sie viele zugefügte Reagentien durch Addition, durch Ausschüttelung wie Anreicherung, sowohl durch Komplexbildung als Ionisierung usw. einzuwirken imstande sind, so ergeben sich daraus Beziehungen zu den Fragen nach der Natur der Enzymvergiftung und Reaktivierung; denn wir wissen vielfach nicht, welchen Anteil Aktivatoren an einer Fermenttätigkeit haben, so daß bisweilen als enzymschädigend betrachtete Eingriffe nicht das Ferment, sondern einen Aktivator zu betreffen brauchen.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **13**, 305. 1909; **29**, 279. 1910; **44**, 495. 1912; C. Neuberg und A. Galambos, diese Zeitschr. **61**, 315. 1914; C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. **71**, 219. 1915.

[2]) Octovalente Verbindungen, zu denen bestimmte Abkömmlinge seltener Platinmetalle zählen, wurden wegen ihrer beträchtlichen Unbeständigkeit in Gegenwart reduzierender organischer Stoffe bisher nicht verwendet.

Die erwähnten Beschleunigungen des Gärungsvorganges lassen sich am einfachsten[1]) bei Versuchen mit Hefemacerationssäften demonstrieren. Der Grund dafür dürfte nach unseren früheren Darlegungen darin beruhen, daß diese Säfte nur mit demjenigen Aktivatorvorrat ausgestattet sind, den die Hefe im Augenblicke der Herrichtung besaß. Stellt man entsprechende Ansätze mit lebenden Hefen an, so muß man damit rechnen, daß infolge des Eiweißstoffwechsels zum mindesten die aldehydischen Katalysatoren auf dem Wege über die α-Ketonsäuren dauernd entstehen, und man wird bei frischen Hefen nicht in allen Fällen den Einfluß der Zugaben zu beobachten imstande sein.

Wir führen einige Versuche mit anorganischen und organischen Stimulatoren an, die auch bei lebenden Hefen einen deutlichen Ausschlag geliefert haben, in ähnlicher Weise wie wir ihn hier früher schon für die Aldehyde und Ketone nachgewiesen hatten. Die Zuckerspaltung durch lebende Hefen wurde beschleunigt durch Pelletierin und Chininonchlorhydrat, durch salzsaures Cystin, Ferri-glycerophosphat, citronensaures Eisenoxyd-Ammoniak, tetrathionsaures Natrium, durch Luteokobaltchlorid, Carbonato-tetrammin-kobaltinitrat sowie schließlich durch Cerichlorid, Ferrisulfat nebst Eisenchlorid. Die Gärungsförderung belief sich bis auf 200%, zeitweise sogar bis auf 500% des Normalumsatzes; bei lebender Hefe waren wir ehedem nur mit obergärigen Sorten erfolgreich gewesen, während wir jetzt auch mit einer untergärigen Rasse zum Ziele kamen. Somit besteht an dem allgemeinen Charakter der Erscheinungen kein Zweifel. Die Phänomene lassen sich mit geeigneten Sorten lebender Hefe, ausnahmslos aber mit Hefesäften als Vorlesungsversuche glatt vorführen.

Streifen möchten wir noch die Möglichkeit von Beziehungen zwischen unseren chemisch definierten Katalysatoren und den bisher bekanntgewordenen nicht in ihre Bestandteile aufgelösten Substanzgemischen, die mit aktivierenden Fähigkeiten ausgestattet sind. Hierhin gehört in

[1]) Wir sind bisher (vgl. hierzu C. Neuberg, diese Zeitschr 88, 153. 1918) keinem gärfähigen Safte begegnet, mit dem die Aktivatoren-Experimente nicht ausführbar gewesen wären. Die benutzten Trockenhefen waren zu recht auseinander liegenden Zeiten und aus ungleichen Sorten hergestellt; die daraus erhaltenen Säfte unterscheiden sich nach Gärkraft, Angärungsdauer und Empfindlichkeit gegen Zusätze, aber die Beeinflußbarkeit durch die Stimulatoren war überall vorhanden.

erster Linie das sogenannte Coferment, das nach unseren[1]) sowie den auch von Harden[2]) gemachten Beobachtungen mehr oder minder weitgehend durch eine Mischung von α-Ketosäuren mit Kaliumphosphat ersetzt werden kann; hinzu treten die von E. Vahlen[3]), K. Kurono[4]), S. Fränkel und J. Fischl[5]) sowie E. Abderhalden und H. Schaumann[6]) beschriebenen Extrakte.

Für das Coferment wie die Gruppe der aldehydischen[7]) Stimulantien ergeben sich wichtige Zusammenhänge mit dem Eiweißumsatz, insbesondere mit dem Aminosäurenstoffwechsel, indem der oxydative Abbau der Proteine über diese Körper führt. Für die Katalysatoren von Fränkel und Fischl sowie Kurono, die durch Ausziehen von Trockenhefe oder embryonalen Pflanzenteilen mit Alkohol gewonnen werden, erscheint eine cofermentartige Komponente nicht ausgeschlossen. Ein gleiches ist betreffs des Aktivators von Abderhalden und Schaumann nicht von der Hand zu weisen[8]); freilich dürfte ihr Substanzgemenge noch andere wirksame Stoffe enthalten; die Autoren schreiben nämlich l. c. S. 90: „Die beschleunigende Wirkung des alkoholischen Hefeextraktes beschränkte sich jedoch nicht auf den Komplex der Zymase, sondern sie erstreckte sich auch auf die von Neuberg entdeckte und ebenfalls in der Bierhefe enthaltene Carboxylase.“ Da nun die Carboxylase nach den 1913 mitgeteilten Erfahrungen von Neuberg und Rosenthal[9]) sowie Harden[10]) unabhängig vom Coferment der Zymase tätig ist, so muß man noch nach anderen Bestandteilen suchen. Die Autoren haben einen Extrakt verwendet, der durch 24stündige gemäßigte Behandlung von Hefe mit 10proz. H_2SO_4 bereitet war; darin könnten auch Substanzen wie Cystin oder Cystinpeptide, den Hefenucleinsäuren entstammende Pentose, ferner das von J. Meisenheimer[11]) in der Hefe nachgewiesene Glucosamin u. a. Verbindungen mehr enthalten sein können, die wir als gärbeschleunigend erkannt hatten. Solches gilt aber namentlich für das erste hierhin gehörige Produkt, das Metabolin von Vahlen; es ist dies ein durch Verkohlung mit Chlorzink und nachfolgende Behandlung mit starker

---

[1]) C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. **71**, 135. 1915; s. a. C. Neuberg, diese Zeitschr. **88**, 201. 1918.

[2]) A. Harden, Biochemical Journ. **11**, 64. 1917.

[3]) E. Vahlen, H. **59**, 194. 1909; **90**, 158. 1914; **106**, 133. 1919.

[4]) K. Kurono, Journ. Coll. Agr. Tokio **5**, 305. 1915.

[5]) S. Fränkel und J. Fischl, Chem. Centralbl. **18**, II, 572.

[6]) E. Abderhalden und H. Schaumann, Arch. f. d. ges. Physiol. **172**, 1. 1918; Chem. Centralbl. **19**, I, 567.

[7]) Vgl. hierüber C. Neuberg und E. Schwenk, l. c.

[8]) Vgl. hierzu H. v. Euler und J. Laurin, Ark. för Kem. **7**, Nr. 28. 1920.

[9]) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. **51**, 128. 1913; Chem. Centralbl. **13**, II, 57.

[10]) A. Harden, Bioch. J. **7**, 214. 1913; Ch. C. **13**, II, 1888.

[11]) J. Meisenheimer, H. **104**, 234. 1919.

Lauge und Säure erzieltes Material aus Pankreas, Hefe oder Kartoffeln; z. T. werden auch noch kräftige Oxydationsmittel, wie $KClO_3$ und starke HCl, angewendet. Der hohe S-Gehalt des Metabolins deutet vielleicht auf locker gebundenes oder sekundär verändertes[1]) Cystin, ferner kann dieses Material alle möglichen „Röstprodukte" einschließen; mehr oder weniger veränderte alkaloidähnliche Substanzen vom Typus des Oryzanins[2]), die weit verbreitet sein sollen, usw.[3]), könnten ebenfalls mit im Spiele sein (über deren Aktivierungseffekt s. vorher S. 292/293). Zieht man weiter in Betracht, daß auch kleine Mengen von Metallsalzen nicht ausgeschlossen sind, so wird man der Möglichkeit Rechnung tragen müssen, daß ein Teil des Einflusses jener bisher undefinierten Katalysatoren auf einer Mitwirkung der von uns gekennzeichneten Gruppen chemischer Individuen beruht.

Daß unsere anorganischen Salze Stimulantien sind, namentlich Eisen-, Zinn- und Kupferverbindungen, scheint besonders beachtenswert, wenn man bedenkt, daß diese Substanzen in praxi aus den Gärgefäßen in die Maischen gelangen können. Aber auch die ungeheure Mannigfaltigkeit der organischen Katalysatoren verdient unsere volle Aufmerksamkeit.

Weiter ergibt sich, daß — wie es bei den Aldehyden von uns schon früher als notwendig bezeichnet ist — auch hinsichtlich der Ketone, der Nitro-, Nitroso- sowie der Hydroxylaminkörper, der Chinone, Disulfide, anorganischer Schwefelverbindungen und vieler Metallsalze mit der Auffassung gebrochen werden muß, daß diese Art von Substanzen schlechthin als Enzym- und Zellgifte betrachtet werden. Vielmehr können sich die Organismen ihrer zur Erzielung besonders lebhafter Stoffwechselvorgänge bedienen[4]).

Im ganzen sehen wir die Natur geradezu wetteifern, den Zuckerumsatz auf dem Wege der Gärung und wohl auch auf dem der Atmung, der damit verwandt ist, mit allen möglichen Mitteln zu unterstützen und zu beschleunigen.

---

[1]) Vgl. hierzu Suter, Baumann (1895) sowie aus späterer Zeit L. Spiegel (Chem. Centralbl. 1901, II, 1356) und E. Friedmann (Beitr. z. chem Phys. u. Pathol. 3, 184. 1903).

[2]) U. Suzuki, T. Shimamura u. S. Odake, diese Zeitschr. 43, 89. 1912; K. Kurono, l. c.

[3]) Den Pyrrolidinring im Hefeneiweiß hat H. Pringsheim (Wochenschr. f. Brauerei 30, 399. 1913) nachgewiesen.

[4]) Wie mit ihrer Hilfe die Vegetabilien mangels eines Nervenapparates auf chemischem Wege ihre Respirationsprozesse regulieren können, haben wir früher angedeutet.

Experimenteller Teil.

Die Anordnung der Versuche war die gleiche, die sich in unseren früheren Mitteilungen bewährt hatte.

A. Ansätze mit zuckerartigen Substanzen.

1. Versuche mit Glykolaldehyd[1]).

a) Saft aus Unterhefe der Brauerei Happoldt.

α) 10,0 ccm Saft, 2,0 ccm 5 proz. Glucoselösung, 1,0 ccm m-Glykolaldehyd.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	5′	10′	15′	25′	30′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
	0,3	2,8	4,0	7,3	8,0	8,9	9,3	10,1	10,9	11,2	11,8	12,5

β) 10,0 ccm Saft, 2,0 ccm 5 proz. Glucoselösung, 1,0 ccm $^m/_{10}$-Glykolaldehyd.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	5′	10′	15′	25′	30′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
	0,7	4,0	4,9	7,8	8,4	9,2	9,5	10,5	11,3	11,5	12,1	12,7

γ) 10,0 ccm Saft, 2,0 ccm 5 proz. Glucoselösung, 1,0 ccm $^m/_{100}$-Glykolaldehyd.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	5′	10′	15′	25′	30′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
	0	0	0	0	0	1,5	3,0	7,0	9,3	9,7	10,4	10,9

δ) 10,0 ccm Saft, 2,0 ccm 5 proz. Glucoselösung, 1,0 ccm Wasser.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	5′	10′	15′	25′	30′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
	0	0	0	0	0	0	0	0	2,7	3,8	7,6	9,5

In besonderen Versuchen haben wir uns davon überzeugt, daß der Glykolaldehyd — wie das für lebende Hefe bekannt ist — auch mit Macerationssäften nicht in Gärung geriet.

In allen folgenden Fällen wurden stets nach demselben Schema

10,0 ccm Hefensaft,

2,0 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung und

1,0 ccm Aktivatorlösung[2]), bzw. 1,0 ccm H_2O in der Kontrolle zusammengebracht.

[1]) Zugänglich aus Dioxymaleinsäure nach C. Neuberg und E. Schwenk, diese Zeitschr. 71, 112. 1915.

[2]) Oder auch Aktivatorsuspension bei schwer oder nicht löslichen Stoffen.

Zur Raumersparnis werden die Resultate in tabellarischen Übersichten wiedergegeben.

b) Saft aus Unterhefe der Schultheißbrauerei.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	15′	20′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′
mit m-Glykolaldehyd . .	0	1,4	4,0	7,2	9,3	10,6	11,4	12,2	13,1	13,3
„ $^m/_{10}$- „ . .	0,6	2,9	5,1	8,3	10,1	11,0	11,6	12,2	13,0	13,1
„ $^m/_{100}$- „ . .	0	0	0	0,4	3,7	7,0	9,3	10,3	11,2	12,0
Kontrolle.	0	0	0	0	0	0,2	0,5	1,2	6,3	10,2

c) Saft aus Unterhefe Nr. 1103 des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.

Temperatur 16°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	20′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′
mit m-Glykolaldehyd . .	0	0,7	3,8	5,6	6,6	8,2	8,8	9,3	9,8
„ $^m/_{10}$- „ . .	1,1	3,7	6,2	7,7	9,4	10,5	10,9	11,2	11,3
„ $^m/_{100}$- „ . .	0	·0	0	0,3	1,7	5,7	7,0	7,7	8,4
Kontrolle	0	0	0	0	0	0,2	0,6	2,3	4,7

d) Saft aus Trockenhefe von Schroder.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit m-Glykolaldehyd . .	1,2	2,7	5,2	6,8	7,7	8,4	8,9
„ $^m/_{10}$- „ . .	1,7	4,0	6,0	7,4	7,9	8,3	8,7
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,1	2,5	4,9	6,7	7,7	8,2	8,5
Kontrolle	0	1,0	2,8	5,7	6,8	7,4	7,8

Der Glykolaldehyd erwies sich also ein äußerst starker Aktivator, da er in ganz ungewöhnlich kurzer Zeit den Eintritt der CO_2-Entwicklung hervorrief. Er übertraf in seinem Beschleunigungsvermögen noch das bisher als kräftigsten aldehydischen Stimulator von uns angesprochene Önanthol. Um die überraschend große Wirkung des Glykolaldehyds genauer zu verfolgen, ist sein Einfluß auf Säfte verschiedener Herkunft geprüft worden Er hat überall seine aktivierende Kraft entfaltet. (Der etwas schwächere Effekt bei dem Saft aus Hefe von Schroder ist darauf zurückzuführen, daß letztere aus dem Jahre 1914 stammte, also schon sehr alt war.) — Die $^m/_{10}$-Konzentration war überall die günstigste.

2. Versuche mit Cellobiose[1].

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′
mit m-Cellobiose	2,1	8,7	10,4	12,0	12,7	13,2	13,6
„ $^m/_{10}$- „	0	5,3	9,0	10,9	11,8	12,3	12,9
„ $^m/_{100}$- „	0	1,0	5,8	8,9	9,7	10,4	11,3
Kontrolle	0	0,5	5,5	9,7	11,3	12,0	12,6

Cellobiose wirkte in der m- und $^m/_{10}$-Konzentration stark aktivierend, während die CO_2-Entbindung bei der $^m/_{100}$-Konzentration nach 90 Minuten von derjenigen im Kontrollsystem erreicht und dann sogar übertroffen wurde, was wohl auf einen Zufall zurückzuführen ist. Cellobiose selbst gärt nicht.

3. Versuche mit d-Glucuronsäure[2].

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	45′	50′	55′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Glucuronsäure .	1,5	3,7	5,2	6,2	7,8	9,4	11,2	11,8
„ $^m/_{100}$- „ .	2,3	4,7	6,1	7,2	9,2	12,0	12,5	12,9
„ $^m/_{1000}$- „ .	2,1	4,5	6,0	7,0	9,0	11,6	12,3	12,7
Kontrolle.	1,0	2,7	5,7	6,8	9,0	11,5	12,2	12,7

4. Versuche mit d, l-Galakturonsäure[3] (als Calciumsalz).

Saft aus Hefe von Schroder.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	55′	60′	65′	70′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Galakturonat . .	2,3	5,3	6,1	7,6	8,3	9,5	10,4	11,3
„ $^m/_{100}$- „ . .	3,6	8,5	9,0	9,9	10,5	11,2	12,3	13,0
„ $^m/_{1000}$- „ . .	4,1	8,8	9,3	9,9	10,4	11,9	11,8	12,4
Kontrolle.	1,4	4,6	6,7	8,5	9,3	10,2	11,0	11,8

Galakturonsäure betätigte sich als Aktivator. Die Gärung setzte am stärksten in dem System mit $^m/_{1000}$-Konzentration ein, wurde aber nach 70 Minuten von der CO_2 Entwicklung in der Anordnung mit $^m/_{100}$-Konzentration überholt. Bei stärkerem Gehalt hemmte dieser Zusatz.

---

[1]) Dargestellt nach J. Madsen, Diss. Hannover 1917 (Laborator. Ost).

[2]) Verwendet wurden reines kristallisiertes Glucuron, bereitet nach den Angaben von C. Neuberg, Ber. 33, 3317. 1900 sowie C. Neuberg und S. Lachmann, diese Zeitschr. 24, 416. 1910.

[3]) Gewinnung nach Emil Fischer, Ber. 23, 937. 1890, und 24, 2142. 1891.

Die freie Glucuronsäure übte in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration eine deutliche, wenn auch schwache Beschleunigung auf die CO_2-Produktion aus, während sie in $^m/_{10}$-Konzentration eine geringe Verzögerung herbeiführte.

5. Versuche mit l-Ketoarabonsäure (als Calciumsalz).
Saft aus Berliner Trockenhefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	40′	45′	50′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Ketoarabonat[1] .	2,2	3,5	4,7	6,3	7,7	8,9	9,6	10,1
„ $^m/_{100}$- „ . .	4,2	5,7	7,6	9,4	10,5	11,4	11,7	12,3
„ $^m/_{1000}$- „ . .	3,6	4,9	5,9	7,5	8,7	9,8	10,3	11,0
Kontrolle.	1,2	2,4	5,0	6,8	7,7	8,7	9,4	9,9

Das ketoarabonsaure Calcium steigerte die CO_2-Entwicklung, besonders in $^m/_{100}$-Konzentration.

B. Ansätze mit aldehydischen und ketonischen Alkaloiden[2]).

6 a. Versuche mit Pelletierin.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	30′	35′	40′	45′	50′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-Pelletierin . . .	0	0,5	1,8	4,0	6,1	7,7	9,7	10,7
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0,7	2,2	4,5	6,2	8,1	9,5	11,5	12,3
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	0,8	2,6	5,0	7,0	8,5	9,6	11,8	12,6
Kontrolle.	0,3	1,3	2,9	4,6	6,3	7,8	9,9	11,0

Pelletierin beschleunigte in $^m/_{100}$- und besonders $^m/_{1000}$-Konzentration; in $^m/_{10}$-Konzentration war es störend.

6 b. Versuche mit bromwasserstoffsaurem Pelletierin.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	30′	35′	40′	45′	50′	60′	75′
mit $^m/_{10}$-Pelletierinbromhydrat	0,8	2,0	3,5	5,2	5,7	7,8	9,3
„ $^m/_{100}$- „	1,0	2,5	3,7	5,5	6,3	8,1	9,5
„ $^m/_{1000}$- „	1,9	3,2	4,7	6,5	7,2	8,7	9,7
Kontrolle.	1,0	2,3	3,7	5,5	6,3	8,1	9,5

[1]) Darstellung siehe bei C. Neuberg und E. Hirschberg, diese Zeitschr. 27, 327. 1910.

[2]) Hier wie im folgenden wurden in Wasser unlösliche Substanzen in verdünntem reinstem, insbesondere aldehydfreiem Alkohol gelöst.

Auch als Salz wirkte das Pelletierin aktivierend, und zwar in $^m/_{1000}$-Konzentration.

7. Versuche mit Pseudo-pelletierin[1]).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	50′	55′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-Pseudo-pelletierin	0,5	1,8	3,8	5,0	7,4	8,5
„ $^m/_{100}$- „	1,0	3,8	6,4	7,7	10,1	10,9
„ $^m/_{1000}$- „	1,3	3,3	5,7	7,0	9,5	10,3
Kontrolle	0,5	1,8	4,2	5,5	8,3	9,3

Pseudo-pelletierin erwies sich als Stimulator, vornehmlich in $^m/_{100}$ Konzentration.

8. Versuche mit Chininonchlorhydrat[2]).

a) Saft aus Hefe von Schroder.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	60′	90′	120′	135′	150′	165′
mit $^m/_{10}$-HCl-Chininon. .	0	0	0	2,9	4,9	6,8
„ $^m/_{100}$- „ . .	0	1,5	4,6	6,6	8,3	9,5
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0	1,0	3,0	5,2	6,7	8,5
Kontrolle	0	0	0,5	4,2	6,4	8,5

b) Saft aus Berliner Trockenhefe.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	60′	75′	90′	105′
mit $^m/_{10}$-HCl-Chininon. .	0	0,8	4,8	7,6
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,5	6,2	9,3	10,3
„ $^m/_{1000}$- „ . .	1,5	6,0	9,1	10,3
Kontrolle	1,0	5,9	9,0	10,3

Chininonchlorhydrat bedingte in $^m/_{100}$-Konzentration eine, allerdings bei verschiedenen Säften ungleiche Förderung der CO_2-Entwicklung.

---

[1]) Das Keton war uns durch die Liebenswürdigkeit der Herren J. v. Braun und K. Heß zugänglich.

[2]) Die freie Base hemmte die Gärung sowohl mittels Saft als mit lebender Hefe (s. S. 325). Das Material ist nach den Angaben von P. Rabe (A. **364**, 330 und **365**, 353. 1909) dargestellt gewesen; der Güte des Entdeckers verdankten wir ein zweites Präparat.

9 a. Versuche mit Hygrin.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Hygrin	0	0	2,9	4,0
„ $^m/_{100}$- „	1,1	4,1	6,9	8,0
„ $^m/_{1000}$- „	0,7	3,2	5,5	6,2
Kontrolle	0,5	2,3	4,5	5,5

Hygrin rief in $^m/_{100}$-Konzentration eine Beschleunigung hervor.

9 b. Versuche mit salzsaurem Hygrin.

Saft aus Münchner Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Hygrinchlorhydrat	1,1	5,6	7,8	9,0	9,4	9,9
„ $^m/_{100}$- „	1,2	6,8	8,5	9,7	10,4	11,3
„ $^m/_{1000}$- „	0,9	5,0	6,9	7,9	8,5	9,3
Kontrolle	0,7	4,7	6,9	7,9	8,5	9,3

Auch salzsaures Hygrin zeigte Aktivierungsvermögen, namentlich in $^m/_{100}$-Konzentration.

10. Versuche mit Cuskhygrin.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Cuskhygrin . .	0	0	1,4	5,3
„ $^m/_{100}$- „ . .	0,5	2,3	5,3	6,9
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,9	4,0	7,1	8,8
Kontrolle	0,5	2,5	5,2	6,7

Cuskhygrin wies in $^m/_{1000}$-Konzentration einen Stimulationseffekt auf.

C. Ansätze mit natürlichen und synthetischen Diketonen und Chinonen.

11. Versuche mit Isatin.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Isatin	2,0	6,4	8,2	9,3	10,1	10,4
„ $^m/_{100}$- „	1,0	3,8	4,8	6,6	7,4	7,6
„ $^m/_{1000}$- „	0,8	2,9	4,3	6,5	7,2	7,5
Kontrolle	0	2,0	4,2	5,8	6,5	6,9

Isatin betätigte sich als guter Aktivator in geradem Verhältnis zur Stärke seiner Konzentration[1]).

12. Versuche mit Alizarin.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-Alizarin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0
„ $^m/_{100}$- „	0,5	1,5	3,5	7,0	8,5	9,4	10,8	11,4	11,9	12,1
„ $^m/_{1000}$- „	0,8	2,1	4,6	8,2	9,8	10,6	12,3	13,0	13,8	14,0
Kontrolle	0	0	0	0	0	0,3	1,7	4,5	7,6	8,4

Alizarin wirkte stark beschleunigend auf die CO_2-Entwicklung, besonders in $^m/_{1000}$-Konzentration; die $^m/_{10}$-Konzentration war störend.

18. Versuche mit Purpurin.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-Purpurin. . . .	0	2,0	4,7	6,6	7,5	8,1	8,5	9,1	10,3	10,5
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0,8	3,8	6,5	7,9	8,8	9,2	9,6	10,0	10,1	10,1
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	0,4	1,1	2,7	3,8	4,5	4,9	5,3	5,5	5,8	6,1
Kontrolle	0	0	0	0	0	0,8	3,2	7,1	8,9	10,5

Purpurin zeigte eine bedeutende Aktivatorkraft, am besten in $^m/_{100}$-Konzentration.

14. Versuche mit Carminsäure.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	60′	65′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Carminsäure . .	0,9	1,3	2,0	7,0	9,8	9,9
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,5	3,3	4,5	7,9	9,5	9,6
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,8	1,9	3,5	7,8	9,5	9,6
Kontrolle	0,5	1,6	3,0	6,9	9,0	9,2

Carminsäure fungierte als ein Stimulans in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration; in $^m/_{10}$-Konzentration verzögerte sich zuerst die CO_2-Entwicklung, überholte jedoch nach 90 Minuten diejenige im Kontrollansatz.

[1]) Eine Vergärung von Isatin selbst, an die man wegen seiner Beziehung zur o-Aminophenylglyoxalsäure (Isatinsäure) hätte denken können, haben wir unter den obwaltenden Bedingungen nicht beobachtet.

15. Versuche mit β-anthrachinon-monosulfosaurem Natrium.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit m/20-Anthrachinon-sulfonat . .	0	0	0	0	0	0	0
„ m/100- „ . .	0	0	0	0,8	1,1	1,7	2,6
„ m/1000- „ . .	0,4	0,8	3,5	6,9	9,0	11,1	12,1
Kontrolle.	0	0	0,7	2,5	4,6	6,3	8,1

Das anthrachinonmonosulfosaure Natrium vermochte sich als Aktivator zu betätigen, jedoch nur, wenn es in geringsten Mengen, wie in m/1000-Konzentration, zur Anwendung gelangte. In m/100-Konzentration wirkte es verlangsamend und in m/100-Konzentration unterband es sogar die CO_2-Produktion.

16. Versuche mit 1, 2-Naphthochinonsulfosäure (-4).

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit m/10-Naphthochinon-sulfosäure . . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ m/100- „ . . .	2,2	6,9	8,6	9,5	10,1	10,6	11,3	11,6	11,9	12,3
„ m/1000- „ . . .	0	0,5	1,8	4,9	8,0	9,1	10,1	10,9	11,5	12,1
Kontrolle.	0	0	0	0,3	1,1	3,4	6,0	7,8	8,7	9,6

Die Naphthochinonsulfosäure beschleunigte in m/100-Konzentration erheblich, auch die m/1000-Konzentration stimulierte noch kräftig, während die m/10-Konzentration eine Hemmung bedingte.

17. Versuche mit Phenanthrenchinon.

Saft aus Trockenhefe von Schroder.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′	195′	210′	225′
mit m/10-Phenanthrenchinon.	2,0	5,7	8,4	9,8	10,9	11,5	11,9	12,1	12,1	12,1	12,1	12,1
„ m/100- „	0,4	0,7	1,8	3,8	7,3	9,2	10,3	10,8	11,3	11,7	12,1	12,2
„ m/1000- „	0	0	0	0,4	1,0	1,8	3,8	6,8	7,9	8,6	9,3	10,8
Kontrolle.	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1,2	2,3	5,7

Im Phenanthrenchinon lag ein ausgezeichneter Aktivator vor, sein Einfluß stand in geradem Verhältnis zur Konzentrationsstärke.

18. Versuche mit 3-Phenanthrenchinon-sulfosäure (als Kaliumsalz).

Saft aus Trockenhefe von Schroder.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	60′	90′	120′	150′	180′	210′	240′
mit m/16-phenantrenchinon-sulfosaurem Kalium	0	2,1	4,9	7,5	10,2	11,8	12,0
„ m/100- „	1,8	4,2	6,7	8,6	10,6	11,9	11,9
„ m/1000- „	0	0	0	0,5	3,8	5,9	9,4
Kontrolle	0	0	0	0	0,4	2,9	5,9

Die 3-Sulfosäure des Phenanthrenchinons[1]) gab sich in Form des Kaliumsalzes gleichfalls als ein gärungsfördernder Stoff zu erkennen, der nur unbedeutend schwächer war als seine Muttersubstanz.

19. Versuche mit Quercetin.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 22°.	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	105′	120′	135′	150′	165′	180′	195′	210′	225′
mit m/10-Quercetin . . .	0	0	0	0	0	0,3	0,7	1,4	2,0
„ m/100- „ . . .	0,4	0,7	1,1	1,7	3,0	5,0	7,3	9,2	9,8
„ m/1000- „ . . .	0	0	0	0,5	1,3	2,3	5,6	8,4	8,9
Kontrolle	0	0	0	0,5	1,1	2,1	5,4	8,3	8,9

Das Quercetin steigerte in m/100-Konzentration.

D. Ansätze mit Stickstoff-Sauerstoff-Verbindungen.

20. Versuche mit Nitroäthan.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′
mit m/10-Nitroäthan . . .	0	0	0,6	1,9	5,0	5,8	7,6	9,2	10,7	11,5
„ m/100- „ . .	0	0	0	0,3	1,4	2,6	3,4	5,7	7,4	8,4
„ m/1000- „ . .	0	0	0	0	0	0	0,9	2,8	5,6	6,9
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0,5	1,9	4,9	6,9

Nitroäthan aktivierte vortrefflich; die stimulierende Kraft sank mit abnehmender Konzentration.

[1]) Dargestellt aus der nach R. Pschorrs (B. 34, 4004. 1901) bewährter Vorschrift leicht zugänglichen reinen 3-Phenanthrensulfosäure; die anderweitig erhältlichen Sulfosäuren sind Gemische wechselnder Zusammensetzung.

21. Versuche mit Nitrosobenzol.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach										
	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-Nitrosobenzol . . .	0,6	4,1	7,8	9,5	10,5	11,0	11,6	12,1	12,3	12,5	12,8
„ $^m/_{100}$- „ . .	0	0	2,7	4,5	5,2	6,6	7,7	8,3	8,9	9,3	9,9
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0	0	0	0	0	0,3	2,5	6,4	8,8	9,4	10,3
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0,3	0,6	3,5	4,9	7,8

Nitrosobenzol war infolge seiner starken Reduzierbarkeit ein guter Stimulator; am besten wirkte es in $^m/_{10}$-Konzentration.

22. Versuche mit p-Nitroso-dimethyl-anilin.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′
mit $^m/_{10}$-p-Nitroso-dimethyl-anilin	0,5	1,9	5,2	7,4	8,9	10,0	11,0	11,7	12,0	12,4
„ $^m/_{100}$- „ .	0,5	1,3	4,3	6,2	7,5	8,7	9,4	10,2	10,5	11,1
„ $^m/_{1000}$- „ .	0	0	0	0	0,3	1,1	1,9	3,6	4,2	5,7
Kontrolle	0	0	0	0	0	0,5	1,1	3,3	4,8	6,6

p-Nitroso-dimethyl-anilin beschleunigte sehr kräftig, am meisten in $^m/_{10}$-Konzentration; auch in $^m/_{1000}$-Konzentration verursachte es anfänglich noch eine geringe Steigerung.

23. Versuche mit α-Nitroso-β-naphthol.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′
mit $^m/_{10}$-Nitroso-β-naphthol	1,0	5,5	8,6	10,2	11,0	11,5	11,9	12,3
„ $^m/_{100}$- „	0,4	1,2	3,2	7,1	9,9	10,8	11,4	11,8
„ $^m/_{1000}$- „	0	0	0	0	0,5	0,9	2,7	4,3
Kontrolle	0	0	0	0	0,4	0,7	2,5	4,0

α-Nitroso-β-naphtol erwies sich als deutlicher Aktivator.

24. Versuche mit Phenylhydroxylamin.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′
mit $^m/_{10}$-Phenylhydroxylamin . . .	1,0	5,4	9,0	10,7	11,7	12,1	12,6
„ $^m/_{100}$- „	0	0,5	1,9	5,7	7,7	9,0	10,0
„ $^m/_{1000}$- „	0	0	0,5	3,8	7,7	9,3	10,0
Kontrolle	0	0	0,3	2,2	5,5	7,0	8,0

Phenylhydroxylaminlösungen fungierten als Stimulantien, deren Wirkungsgrad mit dem Gehalte wuchs.

25. Versuche mit o-Nitrophenol.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit ${}^{m}/_{10}$-o-Nitrophenol .	0,3	0,9	2,4	5,5	7,7	9,5	10,8	11,7
„ ${}^{m}/_{100}$- „ .	0	0,4	0,8	1,5	2,8	4,9	7,8	9,8
„ ${}^{m}/_{1000}$- „ .	0	0,2	0,5	0,9	1,5	4,3	7,5	9,5
Kontrolle	0	0	0	0,3	0,9	4,3	7,5	8,8

o-Nitrophenol erhöhte kräftig die CO_2-Entwicklung, am meisten in ${}^{m}/_{10}$-Konzentration.

26. Versuche mit m-Nitranilin.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	60′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit ${}^{m}/_{10}$-m-Nitranilin . .	0,3	1,2	2,4	4,2	5,5	6,9	8,1	9,1
„ ${}^{m}/_{100}$- „ . .	0	0	0,4	0,7	1,4	3,3	6,0	7,6
„ ${}^{m}/_{1000}$- „ . .	0	0	0	0,3	1,1	3,2	5,6	7,2
Kontrolle	0	0	0	0,3	0,7	1,8	3,4	4,6

m-Nitranilin zeigte deutliche katalytische Kraft.

27. Versuche mit m-Dinitrobenzol.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit ${}^{m}/_{10}$-m-Dinitrobenzol	0,9	2,2	4,7	7,1	8,4	9,0
„ ${}^{m}/_{100}$- „	0	0,5	1,4	3,0	6,1	8,0
„ ${}^{m}/_{1000}$- „	0	0	0	0,7	4,7	7,9
Kontrolle	0	0	0	0,7	2,4	5,5

m-Dinitrobenzol förderte die CO_2-Entwicklung lebhaft in direkter Abhängigkeit von der Stärke der Konzentration.

28. Versuche mit Dinitrophenol (1 : OH, 2 : 4 NO_2).
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit ${}^{m}/_{10}$-Dinitrophenol .	0	0,3	1,4	2,9	5,3	7,2
„ ${}^{m}/_{100}$- „ .	0,7	1,6	4,0	7,8	10,4	11,8
„ ${}^{m}/_{1000}$- „ .	0	0,2	0,8	2,8	6,3	7,8
Kontrolle	0	0	0,4	2,7	6,0	7,4

Auch das Dinitrophenol übte eine Aktivatorwirkung aus, am besten in $^m/_{100}$-Konzentration; der Einfluß war ähnlich wie beim Dinitrobenzol.

29. Versuche mit Trinitrotoluol (1 CH_3, 2, 4, 6 NO_2).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-Trinitrotoluol .	0,5	2,3	7,1	8,6	9,5	10,0	10,5	10,8	11,0	11,3
„ $^m/_{100}$- „ .	0,5	2,3	7,3	8,8	10,3	11,2	11,7	12,0	12,4	12,6
„ $^m/_{1000}$- „ .	0	0	0	0	0,5	1,1	2,8	4,9	6,8	8,2
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	3,9

Im dreifach nitrierten Toluol lag ein vortrefflicher Beschleuniger der Gärung vor; sie setzte gleichzeitig in den Systemen mit $^m/_{10}$- und $^m/_{100}$-Konzentration ein, doch überholte die CO_2-Entwicklung bei $^m/_{100}$-Gehalt nach 75 Minuten die des Ansatzes mit $^m/_{10}$-Konzentration.

30. Vergleichende Versuche mit Nitrobenzol, Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin.

Saft aus Berliner Hefe.

α)

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	15′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-Nitrobenzol	0	0	0,3	0,7	2,4	5,1	8,3	10,0	10,9	11,6	12,1	12,3
„ $^m/_{10}$-Nitrosobenzol . . .	1,3	3,8	5,3	6,7	7,7	8,5	9,3	10,0	10,4	10,9	11,3	11,3
„ $^m/_{10}$-Phenylhydroxylamin.	0	0	0,3	0,5	1,2	4,0	7,2	9,4	11,3	12,6	13,1	13,3
Kontrolle.	0	0	0	0	0	0,3	1,7	5,7	8,8	10,9	11,6	12,0

β)

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	15′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{100}$-Nitrobenz.	0	0	0	0,3	1,2	3,4	6,4	8,4	9,9	10,4	10,9	11,5
„ $^m/_{100}$-Nitrosob.	0,7	1,0	2,4	6,2	9,5	11,0	11,8	12,4	12,9	13,3	13,4	13,4
„ $^m/_{100}$-Phenylhydroxylamin .	0	0	0	0,4	1,4	3,8	6,0	7,8	9,4	10,0	10,4	11,0
Kontrolle.	0	0	0	0	0	0	0,3	1,5	2,7	6,9	10,7	11,2

γ)

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach											
	15′	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{1000}$-Nitrobenz.	0	0	0	0	0	0	0,4	0,9	2,0	5,0	7,2	9,8
„ $^m/_{1000}$-Nitrosob.	0	0	0	0	0,8	2,7	6,2	8,0	8,8	9,7	11,2	12,4
„ $^m/_{1000}$-Phenylhydroxylamin .	0	0	0	0	0	0	0,5	1,0	2,2	5,1	8,3	10,1
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0,2	0,4	0,7	2,3	6,7	9,4

Es erschien interessant, die Reihe der Stickstoff-Sauerstoffverbindungen zu vergleichen; alle drei zeigten ja den Aktivatoreffekt, doch übertraf das Nitrosobenzol bei weitem sowohl Nitrobenzol als auch Phenylhydroxylamin in seiner Stimulationskraft. Die größte Wirkung wurde bei $^m/_{10}$-Konzentration erzielt.

E. Ansätze mit Schwefel- und Selenverbindungen.

81. Versuche mit Cystin-chlorhydrat.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-HCl-Cystin . .	0	0	0	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „ . .	0,6	1,3	3,0	6,1	7,7	8,7	9,5	10,3	11,0
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0	0	0	1,0	3,2	4,3	5,1	6,1	7,2
Kontrolle.	0	0	0	0,7	2,9	4,2	5,5	6,0	7,2

C y s t i n i n s a l z s a u r e r L ö s u n g erwies sich in $^m/_{100}$-Konzentration als Stimulator, während es in $^m/_{10}$-Konzentration eine Hemmung herbeiführte.

82. Versuche mit Cystin-natrium.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Cystin-natrium .	0,7	5,3	8,3	9,2	10,2
„ $^m/_{100}$- „ .	1,1	6,0	9,0	10,3	11,5
„ $^m/_{1000}$- „ .	0,7	3,9	7,8	9,6	11,0
Kontrolle.	0,3	2,8	6,1	7,7	9,7

C y s t i n beschleunigte e b e n f a l l s i n a l k a l i s c h e r L ö s u n g die CO_2-Entwicklung bei $^m/_{100}$-Konzentration; doch war es im Gegensatz zu Cystinchlorhydrat auch in $^m/_{10}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration noch fördernd.

83. Versuche mit Di-thiomilchsäure.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Di-thiomilchsäure	0,8	3,4	5,2	8,2	9,9
„ $^m/_{100}$- „	0,6	3,5	5,5	8,9	10,2
„ $^m/_{1000}$- „	0,4	2,9	6,2	7,9	8,4
Kontrolle	0	1,6	5,7	7,1	7,9

Di-thiomilchsäure $\begin{matrix} CH_3 \cdot CHS \cdot COOH \\ | \\ CH_3 \cdot CHS \cdot COOH \end{matrix}$ begünstigte die Gärung, besonders in $^m/_{100}$-Konzentration, während zum Vergleich angesetzte Versuche mit Thiomilchsäure, $CH_3 \cdot CH(SH) \cdot COOH$, einen verzögernden Einfluß ergaben.

84. Versuche mit Di-thioglykolsäure.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	55′	60′	65′	70′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Di-thioglykolsäure	0	0	0	0	0,9	2,2	4,6	7,1
„ $^m/_{100}$- „	0,7	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,1	7,3
„ $^m/_{1000}$- „	1,9	3,8	5,0	6,0	6,8	8,8	9,9	10,7
Kontrolle	0,1	2,6	3,5	4,8	5,8	7,8	8,8	9,4

Di-thioglykolsäure, $\begin{matrix} S \cdot CH_2 \cdot COOH, \\ | \\ S \cdot CH_2 \cdot COOH \end{matrix}$ verstärkte in ihrer Eigenschaft als Disulfid die CO_2-Entbindung, namentlich in $^m/_{1000}$-Konzentration. Die Vergleichsobjekte Thioglykolsäure, $HS \cdot CH_2 \cdot COOH$, und Thiodiglykolsäure, $S(CH_2 \cdot COOH)_2$, dagegen zeigten eine hemmende oder gar keine Einwirkung.

85. Versuche mit Natriumdisulfid, Na_2S_2.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Na_2S_2	0	0	0	3,5	5,7	7,4
„ $^m/_{100}$- „	1,5	5,5	10,1	11,8	12,4	13,0
„ $^m/_{1000}$- „	1,0	4,7	9,0	10,9	11,6	12,0
Kontrolle	0,7	3,7	8,0	9,5	10,2	10,6

Natriumdisulfid aktivierte vornehmlich in $^m/_{100}$-Konzentration.

86. Versuche mit Natriumtrisulfid, Na_2S_3.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Na_2S_3	0	0	0	1,8	4,0
„ $^m/_{100}$- „	0,8	3,3	6,9	8,8	9,9
„ $^m/_{1000}$- „	1,6	5,1	7,3	8,9	9,9
Kontrolle........	1,0	4,3	6,4	8,3	9,5

Natriumtrisulfid war ein schwaches Stimulans; hier war die $^m/_{1000}$-Konzentration die günstigste.

87. Versuche mit Natriumpentasulfid, Na_2S_5.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Na_2S_5	0	0	0	2,1	4,1
„ $^m/_{100}$- „	0,6	1,5	3,8	8,1	9,8
„ $^m/_{1000}$- „	1,5	4,4	6,8	8,5	9,5
Kontrolle........	0,7	3,0	4,5	6,5	7,7

Natriumpentasulfid beschleunigte gleichfalls die CO_2-Entwicklung in $^m/_{1000}$-Konzentration.

88. Versuche mit Natriumtetrathionat, $Na_2S_4O_6$.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	75′	80′	85′	90′	95′	100′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$Na_2S_4O_6$....	0	0	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „	0	0,5	1,6	3,0	4,8	6,0	8,5	9,5
„ $^m/_{1000}$- „	1,0	3,0	5,5	7,2	8,3	9,1	10,0	10,4
Kontrolle........	0,4	1,7	4,4	5,7	7,0	8,0	9,5	10,0

Natriumtetrathionat wirkt als Stimulator, jedoch nur in $^m/_{1000}$-Konzentration; bei höherem Gehalt hemmte es beträchtlich[1]).

[1]) Es ist bemerkenswert, daß diese Verbindung auch in der Natur als Produkt der Umwandlung von unterschwefligsaurem Natrium durch gewisse Thiobacillen nach A. Nathanson (Mitt. d. zool. Stat. Neapel **15**, 655. 1902) vorkommt.

39. Versuche mit Natriumsulfantimoniat (Schlippeschem Salz).

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach		
	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Na_3SbS_4	0,5	1,5	3,2
„ $^m/_{100}$- „	4,7	8,5	9,7
„ $^m/_{1000}$- „	3,8	8,2	9,4
Kontrolle	1,3	7,8	9,2

Natriumsulfantimoniat regte die CO_2-Entwicklung in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration an, während es bei stärkerem Gehalte störte.

40. Versuche mit Natriumsulfoxyarsenat, Na_3AsO_3S.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	55′	60′	65′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Na_3AsO_3S . . .	0	0	0	0	2,3	5,3	7,8
„ $^m/_{100}$- „ . . .	3,6	4,7	5,9	7,8	10,0	10,9	11,3
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	4,3	6,0	7,1	8,4	9,9	10,4	10,9
Kontrolle	2,0	4,1	5,3	6,9	8,8	9,4	10,0

Natriumsulfoxyarsenat betätigte sich bei $^m/_{1000}$- und $^m/_{100}$-Konzentration als Aktivator; in $^m/_{10}$-Konzentration verursachte es eine Hemmung der CO_2-Entwicklung.

41. Versuche mit Natriumsulfocarbonat, Na_2CS_3.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	75′	90′	105′	120′	135′	150′
mit $^m/_{10}$-Na_2CS_3	0	0	0	1,7	6,8	9,6
„ $^m/_{100}$- „	3,9	8,3	9,7	10,8	11,5	11,8
„ $^m/_{1000}$- „	1,0	7,6	9,3	10,6	11,2	11,7
Kontrolle	0,7	5,8	7,4	8,4	8,9	9,2

Natriumtrithiocarbonat beschleunigte in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration, während es in $^m/_{10}$-Konzentration einen verlangsamenden Einfluß auf den Gärakt entfaltete.

42. Versuche mit Kaliumselenosulfat, K_2SSeO_3.

(Bei Gmelin-Kraut (II, 1. 88) wohl unzweckmäßig als selendithionsaures Salz bezeichnet.)

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	30′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-K_2SSeO_3 . . .	0	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	1,4	5,9	7,6	8,6	10,3	10,9
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	2,7	6,0	9,9	11,2	11,5	12,9	13,4
Kontrolle	2,1	5,5	8,9	10,1	10,8	12,3	12,5

Kaliumselenosulfat förderte schwach in $^m/_{1000}$-Konzentration, verzögerte in $^m/_{100}$-Konzentration und hob in $^m/_{10}$-Konzentration die Gärung völlig auf.

43. Versuche mit kolloidalem Schwefel.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	60′	75′	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit m-S-Suspension . . .	0,7	3,4	7,4	9,1	10,1	10,7	11,3	11,8	12,3
„ $^m/_{10}$- „	0	0	0,9	2,8	6,4	9,0	10,8	12,0	12,7
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	0	0,5	1,6	3,6	6,7	8,8	10,0	11,2
Kontrolle	0	0	0,4	1,3	3,3	6,2	8,3	9,7	10,7

Kolloidaler Schwefel, in Wasser aufgeschwemmt, wirkte in m-Konzentration lebhaft beschleunigend auf die CO_2-Entwicklung; auch die schwächeren Konzentrationen zeigten ein, wennauch entsprechend niedrigeres Aktivierungsvermögen.

44. Versuche mit kolloidalem Selen[1]).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	45′	60′	65′	70′	75′	90′	105′	120′
mit m-Se-Suspension . .	1,8	4,8	7,0	8,3	9,0	10,5	11,4	11,8
„ $^m/_{10}$- „ . .	1,7	4,7	6,3	7,5	8,1	10,0	10,8	11,4
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,4	3,9	5,5	6,8	7,4	9,3	10,3	10,9
Kontrolle	1,0	2,3	4,8	6,1	6,7	8,7	10,0	10,6

Das kolloidale Selen beeinflußte die Gärung ähnlich wie Schwefel in Abhängigkeit von der Konzentrationsstärke, jedoch im ganzen weniger.

[1]) Präparat von Heyden-Radebeul.

45. Versuche mit Selencyannatrium, NaCNSe.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^{m}/_{10}$-NaCNSe	0,7	2,0	5,5	8,2	9,6	10,4	10,9
„ $^{m}/_{100}$- „	0	0,5	1,3	4,4	6,8	8,5	9,2
„ $^{m}/_{1000}$- „	0	0,4	0,8	3,8	7,0	8,3	9,5
Kontrolle	0	0,4	0,8	2,6	6,3	8,0	8,7

Selencyannatrium erwies sich als deutlicher Aktivator, vorwiegend in $^{m}/_{10}$-Konzentration.

46. Versuche mit Kalium-xanthogenat, $C_2H_5O \cdot CSSK$.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach									
	45′	50′	55′	60′	65′	70′	75′	90′	105′	120′
mit $^{m}/_{10}$-Xanthogenat . .	0,7	1,9	3,5	4,7	5,9	7,1	8,2	9,9	10,3	10,6
„ $^{m}/_{100}$- „ . .	1,4	3,2	4,7	5,9	7,0	7,7	8,0	8,8	9,3	9,5
„ $^{m}/_{1000}$- „ . .	1,8	3,9	6,0	7,2	8,1	8,8	9,3	10,4	10,7	11,0
Kontrolle	1,4	2,9	4,4	5,3	6,2	6,9	7,5	8,6	9,5	10,0

Xanthogensaures Kalium beschleunigte am ehesten in $^{m}/_{1000}$-Konzentration; der Ansatz mit $^{m}/_{10}$-Konzentration zeigte zuerst eine schwache Verzögerung der Gärung, nach 70 Minuten überholte aber die CO_2-Entwicklung doch diejenige im Kontrollsystem.

F. Ansätze mit Metallverbindungen.

47. Versuche mit Ferrichlorid[1]).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^{m}/_{10}$-$FeCl_3$	2,8	6,5	7,5	8,4
„ $^{m}/_{100}$- „	0,5	3,3	5,5	7,5
„ $^{m}/_{1000}$- „	0	1,8	4,9	7,8
Kontrolle	0	1,4	4,5	8,4

Auch das anorganische Salz Ferrichlorid erwies sich als guter Aktivator, besonders in $^{m}/_{10}$-Konzentration.

[1]) Beim Eisenchlorid und anderen Metallsalzen beobachtet man öfter, namentlich an den stärker konzentrierten Lösungen, eine Ausflockung. Von dieser scheint dann die CO_2-Entwicklung in der Hauptsache auszugehen. Ähnliche Vorgänge kann man manchmal wahrnehmen, wenn an Stelle des Saftes lebende Hefen (s. S. 327) verwendet werden.

Zur Prüfung unserer Ansicht, daß die stimulierende Wirkung nur der höheren Oxydationsstufe zukomme, wurde ein entsprechender Versuch mit Ferrochlorid angesetzt. Ergebnis: Das Salz des zweiwertigen Eisens übte keine Stimulationswirkung auf den Gärakt aus.

48. Versuche mit Ferrisulfat.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$Fe_2(SO_4)_3$ . . .	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „ . . .	1,5	5,2	7,4	8,9	9,4
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	1,1	4,8	7,1	8,5	8,9
Kontrolle	0,8	4,8	7,0	8,4	8,8

Ferrisulfat förderte in $^m/_{100}$-Konzentration die CO_2-Entwicklung; der Vergleichsversuch mit Ferrosulfat ergab die Wirkungslosigkeit auch dieses Oxydulsalzes.

49. Versuche mit glycerinphosphorsaurem Eisenoxyd.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Ferri-glycero-phosphat.	3,0	7,9	10,5	12,9	13,4	13,6
„ $^m/_{100}$- „ . .	0,7	4,8	8,2	11,3	11,8	12,0
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,5	4,0	7,8	11,2	11,9	12,1
Kontrolle	0,4	3,2	4,9	6,8	7,2	7,4

Glycerinphosphorsaures Eisenoxyd war ein deutlicher Aktivator.

50. Versuche mit citronensaurem Eisenoxyd-Ammoniak.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Ferri-ammonium-citrat . .	1,9	4,7	6,7	7,8	9,5	10,5
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,1	3,5	5,3	6,2	7,9	8,8
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,9	3,5	4,7	5,3	7,0	8,2
Kontrolle	0,8	3,2	4,0	4,9	5,8	7,5

Citronensaures Eisenoxyd-Ammoniak wies den Stimulatoreffekt auf.

51. Versuche mit Ferricyankalium.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach						
	90′	105′	120′	135′	150′	165′	180′
mit $^m/_{10}$-$K_3Fe(CN)_6$ . . .	0	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	1,0	6,7	9,5	10,7	11,5	11,8	12,0
Kontrolle	1,4	4,4	6,5	7,8	8,8	9,1	9,4

Auch das Ferricyankalium löste in seiner Eigenschaft als reduzierbarer Körper eine Gärungsbeschleunigung aus, doch nur in der schwächsten, in der $^m/_{1000}$-Konzentration; bei stärkerem Gehalt verhinderte es die CO_2-Entwicklung.

52. Versuche mit Cuprichlorid.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$CuCl_2$	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „	2,0	6,2	7,3	9,0
„ $^m/_{1000}$- „	0,5	3,8	4,9	6,8
Kontrolle	0,5	4,7	5,8	7,5

Beim Kupferchlorid war die $^m/_{100}$-Konzentration gärfördernd.

53. Versuche mit Cuprisulfat.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$CuSO_4$	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „	1,1	3,3	5,3	6,7
„ $^m/_{1000}$- „	0	2,0	4,0	5,7
Kontrolle	0	1,9	4,0	5,7

Schwefelsaures Kupfer wirkte in $^m/_{100}$-Konzentration aktivierend, während es bei $^m/_{1000}$-Konzentration keinen Einfluß mehr entfaltete und in $^m/_{10}$-Konzentration hemmte.

54. Versuche mit Glykokoll-kupfer.
Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Glykokollkupfer	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „	0,5	2,0	6,3	8,3
„ $^m/_{1000}$- „	0	0,7	3,3	7,4
Kontrolle	0	0,5	2,5	6,8

Auch im Glykokollkupfer besaß das Metall Stimulationsvermögen.

55. Versuche mit Stanni-Ammonium-chlorid (Pinksalz).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	50′	55′	60′	65′	70′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$(NH_4)_2SnCl_6$ . .	0	0	0	0,4	1,0	2,0	3,6	7,6	9,2
„ $^m/_{100}$- „ . .	0,8	2,4	5,6	7,0	8,0	8,5	9,6	10,8	11,5
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,5	1,8	4,5	6,0	7,2	8,0	9,6	10,8	11,5
Kontrolle	0	1,1	2,8	4,7	6,4	7,5	9,5	10,8	11,5

Zinntetrachlorid beschleunigte in Form seines Doppelsalzes mit Salmiak bei $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration, während es in höherer Stärke erklärlicherweise den Gärungsvorgang schädigte.

56. Versuche mit Cerichlorid.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	30′	45′	50′	60′	65′	75′	90′	105′
mit $^m/_{10}$-$CeCl_4$[1].	1,0	1,8	3,9	5,2	6,8	8,2	10,7	11,1
„ $^m/_{100}$- „	0	0	0,5	1,0	2,8	5,8	8,4	9,4
„ $^m/_{1000}$- „	0	0	0	0,5	1,3	4,4	7,2	8,3
Kontrolle	0	0	0	0	0,8	3,4	6,8	7,8

Cerichlorid förderte aufs deutlichste die CO_2-Entwicklung im unmittelbaren Verhältnis zur Höhe der Konzentration.

57. Versuche mit vanadinsaurem Natrium.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$NaVO_3$	0	1,6	3,1	6,5	8,0
„ $^m/_{100}$- „	0,7	5,1	6,5	8,3	9,3
„ $^m/_{1000}$- „	1,0	5,5	6,7	8,0	9,0
Kontrolle	0,4	4,0	5,0	6,8	7,4

Natriummetavandat, ein Derivat des fünfwertigen Vanadiums, verstärkte in $^m/_{100}$- sowie $^m/_{1000}$-Konzentration und schädigte in $^m/_{10}$-Konzentration den Gärakt.

[1]) Verwendet wurde stets eine salzsaure Lösung, in der nach R. J. Meyer und O. Hauser (Analyse der seltenen Erden und der Erdsäuren, Stuttgart 1912, S. 83) die complexe Chlorosäure H_2CeCl_6 anzunehmen ist.

58. Versuche mit Uranylsulfat.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$UrO_2(SO_4)$ . . .	0,5	1,6	5,6	6,8	7,9	8,8
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	0	2,9	5,4	6,9	7,9
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	0	0	1,6	4,4	6,5	7,8
Kontrolle	0	0	1,3	3,8	6,0	7,4

Uranylsulfat aktivierte am besten in $^m/_{10}$-Konzentration, und zwar nicht unerheblich.

59. Versuche mit Kalium-hexasulfo-molybdat[1]).

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 16°	Entwickelte ccm CO_2 näch					
	30′	60′	90′	120′	150′	180′
mit $^m/_{10}$-$K \cdot S_3 \cdot MoS_3$ . .	0	0	2,0	5,0	7,3	9,5
„ $^m/_{100}$- „ . .	1,1	3,9	6,8	8,8	9,5	10,2
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,4	2,2	5,3	7,4	8,8	9,8
Kontrolle	0	0	1,2	4,1	7,0	9,8

Das hexasulfo-molybdänsaure Kalium, das gleichzeitig den Trisulfidrest und Metall in hochoxydierter (siebenwertiger) Stufe aufweist, entfaltete eine sehr deutliche katalytische Kraft.

60. Versuche mit Hexammin-kobalti-trichlorid.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach							
	30′	45′	50′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_6]Cl_3$.	0	0	0	1,4	2,3	6,1	9,6	11,5
„ $^m/_{100}$- „ .	0,8	5,9	8,1	10,2	11,1	11,6	12,4	13,0
„ $^n/_{1000}$- „ .	0,7	5,6	7,3	9,3	10,3	11,1	11,6	12,2
Kontrolle	0,2	4,5	6,0	7,9	9,0	10,0	10,4	10,9

Das sogenannte Luteokobalichlorid stimulierte in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration.

---

[1]) Dargestellt nach K. A. Hofmann, Zeitschr. f. anorg. Chem. 12, 58, 1896.

61. Versuche mit Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_4(CO_3)]NO_3$.	0,5	4,5	6,0	7,4	8,3	9,1
„ $^m/_{100}$- „ .	2,8	5,9	7,3	8,3	9,0	9,5
„ $^m/_{1000}$- „ .	2,9	7,0	8,1	9,0	9,7	10,6
Kontrolle	2,0	5,5	6,6	7,5	8,2	9,1

Beim Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat trat ein beschleunigender Einfluß bei der $^m/_{1000}$-, schwächer auch bei der $^m/_{100}$-Konzentration zutage, während die $^m/_{10}$-Konzentration eine Schädigung hervorrief.

62. Versuche mit Trinitrato-triammin-kobalt.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 19°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_3(NO_3)_3]$	0	0	1,3	3,0	4,0
„ $^m/_{100}$- „	0,3	1,9	4,8	5,8	6,4
„ $^m/_{1000}$- „	0,9	3,8	6,1	7,4	8,0
Kontrolle	0,5	2,3	3,8	4,6	5,0

Trinitrato-triammin-kobalt wirkte als Aktivator deutlich nur in $^m/_{1000}$-Konzentration; in $^m/_{100}$-Konzentration war die Steigerung erst nach 90 Minuten merkbar.

63. Versuche mit Hexammin-kobalti-trichlorid.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	30′	35′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[CO(NH_3)_6]Cl_3$.	0,3	0,8	1,3	2,1	2,8	4,7	5,6	6,1	6,5
„ $^m/_{100}$- „ .	1,4	2,7	3,8	4,6	5,9	6,8	7,8	8,3	9,0
„ $^m/_{1000}$- „ .	1,9	3,6	5,4	6,8	8,8	10,0	11,0	11,5	12,0
Kontrolle	1,0	1,8	2,5	3,5	4,5	5,0	5,8	6,4	7,0

64. Versuche mit Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	30′	35′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_4(CO_3)]NO_3$	0,5	2,0	4,4	6,4	7,9	9,4	10,8	11,5	11,9
„ $^m/_{100}$- „	1,3	3,0	6,5	8,4	9,7	11,5	12,4	13,0	13,5
„ $^m/_{1000}$- „	1,5	3,5	6,5	8,1	9,4	11,2	12,1	12,8	13,2
Kontrolle	0,8	2,2	5,7	7,7	9,1	10,5	11,3	11,8	12,4

65. Versuche mit Trinitrato-triammin-kobalt.

Saft aus Berliner Hefe.

Temperatur 21°	Entwickelte ccm CO_2 nach								
	30′	35′	40′	45′	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_3(NO_2)_3]$	0,5	1,1	2,0	3,0	6,0	7,8	9,1	9,8	10,3
„ $^m/_{100}$- „	2,0	3,9	5,6	7,0	8,7	9,8	11,0	11,7	12,2
„ $^m/_{1000}$- „	2,7	4,4	5,8	7,0	8,8	10,1	11,1	12,3	13,0
Kontrolle	0,9	3,1	4,2	5,2	7,0	7,7	8,5	9,2	9,8

Um die Aktivatorwirkung der drei in den Vers. Nr. 60—62 benutzten Kobaltisalze ganz sicherzustellen, wurde sie nochmals mit einem Saft anderer Herkunft (Vers. Nr. 63—65) geprüft. Es ergab sich durchgehends die Bestätigung für den fördernden Einfluß der betr. Kobaltiverbindungen auf die CO_2-Entwicklung.

66. Versuche mit Kalium-tetra-nitro-diammin-kobaltiat.

Saft aus Münchener Trockenhefe.

Temperatur 17°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]K$	0	0	0	2,8	3,5
„ $^m/_{100}$- „	1,0	2,8	5,3	6,9	9,3
„ $^m/_{1000}$- „	2,7	6,0	7,9	9,2	10,6
Kontrolle	1,9	4,5	7,0	8,3	10,3

Kalium-tetranitro-diammin-kobaltiat beschleunigte die Gärung in $^m/_{1000}$-Konzentration, bei stärkerem Gehalt erwies es sich als hemmend.

Der zum Vergleich mit diesen verschiedenen trivalenten Kobaltverbindungen für ein Oxydulsalz, mit Kobaltochlorid, durchgeführte Versuch tat die Wirkungslosigkeit des Metalls in der zweiten Wertigkeitsstufe dar.

G. Ansätze mit lebenden Hefen.

Zu den Versuchen mit frischen Hefen wurde immer eine Suspension von 2,5 g Zellen in 100 ccm Wasser verwendet.

Das Mischungsverhältnis war hierbei stets

10,0 ccm Hefensuspension,

5,0 ccm 5 proz. Traubenzuckerlösung und

1,0 ccm Aktivatorlösung, bzw. 1,0 ccm H_2O in der Kontrolle.

I. Ansätze mit käuflicher obergäriger Bierhefe (Senst).

67. Versuche mit Pelletierin.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	60′	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Pelletierin . . .	0	0	0,7	1,6	2,8
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0,5	1,8	3,4	6,2	8,2
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	0,6	1,9	3,5	6,2	8,3
Kontrolle	0,4	1,2	2,4	4,4	6,6

Pelletierin aktivierte also auch bei lebender Hefe, und zwar in $^m/_{100}$- und $^m/_{1000}$-Konzentration.

68. Versuche mit HCl-Chininon.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	45′	60′	75′	90′	105′
mit $^m/_{10}$-Chininonchlorhydrat . .	0	0	0	1,2	1,8
„ $^m/_{100}$- „ . .	0,5	1,8	3,8	6,5	9,2
„ $^m/_{1000}$- „ . .	0,9	2,4	4,5	7,2	9,4
Kontrolle	0,7	1,4	3,1	5,9	9,2

Chininonchlorhydrat beschleunigte am deutlichsten in $^m/_{1000}$-Konzentration.

69. Versuche mit Cystin-chlorhydrat.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	45′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-HCl-Cystin . . .	0	0	0	0,8
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	0	1,5	2,4
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	1,5	2,7	4,5	5,9
Kontrolle	1,0	2,3	3,9	5,4

Cystin-chlorhydrat zeigte in $^m/_{1000}$-Konzentration einen schwachen Stimulationseffekt.

70. Versuche mit glycerin-phosphorsaurem Eisen.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	30′	45′	60′	75′
mit $^m/_{10}$-Ferri-glycerophosphat.	1,1	2,9	6,9	8,4
„ $^m/_{100}$- „	0,8	2,5	6,0	8,8
„ $^m/_{1000}$- „	0,8	2,2	5,7	8,5
Kontrolle	0,8	2,2	5,7	8,5

Glycerinphosphorsaures Eisenoxyd förderte etwas in $^m/_{10}$-Konzentration.

71. Versuche mit citronensaurem Eisenoxyd-Ammoniak.

Temperatur 25°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	30′	45′	60′	75′
mit $^m/_{10}$-Ferri-ammoncitrat	1,3	4,4	8,5	11,0
„ $^m/_{100}$- „	0,8	3,4	6,9	9,3
„ $^m/_{1000}$- „	0,7	2,8	5,8	7,9
Kontrolle	0,6	2,5	5,2	7,2

Citronensaures Eisenoxyd-Ammoniak beschleunigte die CO_2-Entwicklung. Der Einfluß sank mit der Höhe der Konzentration.

72. Versuche mit Natriumtetrathionat.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	30′	45′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-$Na_2S_4O_6$	0,9	3,1	6,3	7,9	8,5
„ $^m/_{100}$- „	1,0	3,3	6,2	7,8	9,1
„ $^m/_{1000}$- „	0,9	3,1	5,5	7,1	8,1
Kontrolle	0,5	2,4	4,6	6,1	7,5

Tetrathionsaures Natrium wirkte anregend auf die CO_2-Entwicklung, am meisten in $^m/_{100}$-Konzentration.

73. Versuche mit Hexammin-kobalti-chlorid.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	30′	45′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-Luteocobalti-chlorid	0,4	0,9	1,4	3,3	5,0
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0,8	1,6	2,8	5,3	6,9
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	1,9	3,0	4,4	6,5	8,0
Kontrolle	1,1	2,4	4,0	6,3	7,9

Hexammin-kobalti-trichlorid beschleunigte die Gärung mit lebender Hefe in $^m/_{1000}$-Konzentration, in anderen Stärken wirkte es hemmend.

74. Versuche mit Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	30′	45′	60′	75′	90′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_4(CO_3)]NO_3$.	1,6	3,3	6,2	7,4	9,2
„ $^m/_{100}$- „ .	1,8	3,9	7,0	8,2	10,3
„ $^m/_{1000}$- „ .	1,5	3,0	5,8	7,0	8,8
Kontrolle	1,3	2,6	5,3	6,2	7,9

Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat war ein deutlicher Aktivator in $^m/_{100}$-Konzentration.

75. Versuche mit Cerichlorid.

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	30′	45′	60′	75′	90′	105′
mit $^m/_{10}$-$CeCl_4$	0	0	0,5	1,0	1,6	2,0
„ $^m/_{100}$- „	1,1	1,7	2,3	3,2	3,8	4,8
„ $^m/_{1000}$- „	0	0,4	1,3	2,6	3,7	4,8
Kontrolle	0	0,4	1,0	2,5	3,9	5,3

Cerichlorid beschleunigte den Eintritt der Gärung mit lebender Hefe unverkennbar; es stimulierte am besten in $^m/_{100}$-Konzentration, doch überholte die CO_2-Entwicklung im Kontrollsystem nach 105 Minuten diejenige der Anordnungen mit Aktivator.

76. Versuche mit Ferrisulfat.

Temperatur 25°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	30′	45′	60′	75′
mit $^m/_{10}$-$Fe_2(SO_4)_3$ . . .	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „ . . .	0	0	0,7	1,3
„ $^m/_{1000}$- „ . . .	1,2	5,7	7,5	9,7
Kontrolle	1,0	5,0	6,6	8,6

Ferrisulfat beförderte die CO_2-Produktion etwas in der $^m/_{1000}$-Konzentration, in den stärkeren Konzentrationen wirkte es hemmend.

77. Versuche mit Ferrichlorid.

a)

Temperatur 20°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	60′	75′	90′	105′	120′	135′
mit $^m/_{10}$-$FeCl_3$	0	0	0	0	0	0
„ $^m/_{100}$- „	1,1	2,4	3,6	4,8	6,4	7,6
„ $^m/_{1000}$- „	1,0	2,5	3,5	4,7	6,0	7,0
Kontrolle	0,8	1,9	2,9	4,4	5,9	7,0

b)

Temperatur 18°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	30′	45′	60′	75′
mit $^m/_{500}$-$FeCl_3$	2,0	4,1	6,0	7,5
„ $^m/_{1000}$- „	0,8	2,6	5,9	8,8
„ $^m/_{10\,000}$- „	0,4	1,9	4,6	7,3
Kontrolle	0,5	1,7	3,9	6,0

Ferrichlorid vermochte die CO_2-Entbindung lebhaft anzuregen. Die $^m/_{500}$-Konzentration erwies sich dafür als die günstigste.

II. Ansätze mit frischer obergäriger Hefe M des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin (Brennereihefe.)

78. Versuche mit Eisenchlorid.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach					
	75′	90′	105′	120′	135′	150′
mit $^m/_{10}$-$FeCl_3$	1,4	2,0	3,0	4,3	4,9	6,3
„ $^m/_{100}$- „	0,5	1,0	1,7	2,9	3,8	5,2
„ $^m/_{1000}$- „	0,5	1,0	1,7	2,8	3,5	4,5
Kontrolle	0,3	0,7	1,3	2,4	3,2	4,4

79. Versuche mit glycerinphosphorsaurem Eisenoxyd.

Temperatur 23°	Entwickelte ccm CO_2 nach				
	90′	105′	120′	135′	150′
mit $^m/_{10}$-Ferri-glycero-phosphat	1,2	1,9	2,9	4,3	5,7
„ $^m/_{100}$- „	0,9	1,7	2,6	4,0	5,1
„ $^m/_{1000}$- „	0,9	1,6	2,4	3,8	5,0
Kontrolle	0,9	1,6	2,4	3,8	4,9

Ferrichlorid und glycerinphosphorsaures Eisenoxyd beschleunigten die CO_2-Entwicklung auch bei dieser obergärigen Hefenrasse, doch ist hier die $^m/_{10}$-Konzentration die vorteilhafteste gewesen.

III. Ansätze mit lebender untergäriger Bierhefe U des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin.

80. Versuche mit Ferrichlorid.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{100}$-$FeCl_3$	1,9	2,6	3,5	4,5
„ $^m/_{500}$- „	0	0,9	1,3	3,0
„ $^m/_{1000}$- „	0	0,7	1,2	2,5
Kontrolle	0	0,5	1,1	2,3

81. Versuche mit glycerin-phosphorsaurem Eisenoxyd.

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach			
	75′	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-Ferri-glycero-phosphat	0,9	1,9	3,0	3,8
„ $^m/_{100}$- „	0,5	1,2	2,3	3,2
„ $^m/_{1000}$- „	0,5	1,1	1,9	2,4
Kontrolle	0,5	0,8	1,4	1,9

82. **Versuche mit Carbonato-tetrammin-kobalti-nitrat.**

Temperatur 22°	Entwickelte ccm CO_2 nach		
	90′	105′	120′
mit $^m/_{10}$-$[Co(NH_3)_4(CO_3)]NO_3$	1,7	2,5	2,8
„ $^m/_{100}$- „	0,6	1,7	2,6
„ $^m/_{1000}$- „	0,6	1,5	2,5
Kontrolle	0,4	1,2	2,2

Auch bei der Vergärung mittels lebender Unterhefe entfalteten also Ferrichlorid, glycerinphosphorsaures Eisenoxyd sowie Carbonato-tetrammin-cobalti-nitrat ihr Aktivierungsvermögen.

Wenn beim lebenden Objekt die Stimulationskraft der mineralischen und organischen Zusätze im allgemeinen nicht so stark zum Ausdruck kommt, wie bei den enzymatischen Ansätzen, so ist — außer dem bereits früher dargelegten Grunde, dem beschränkten Vorrat der reinen Fermentsysteme an natürlichen Aktivatoren — zu berücksichtigen, daß bei den zelligen Gebilden keine homogene Verteilung der Katalysatoren zu erwarten ist; man muß vielmehr annehmen, daß sie je nach ihrem chemischen Charakter zu verschiedenen Protoplasmaschichten in Beziehung treten. Da wir trotzdem in vielen Fällen auch an den lebenden Organismen den gleichartigen Effekt der Zulagen beobachten, also ihr Vordringen zu den intracellulären Fermenten des Kohlenhydratstoffwechsels feststellen, so darf man auf Grund dieser sehr befriedigenden Übereinstimmung, die zwischen dem Verhalten zellfreier und mit Zellen arbeitender Anordnungen besteht, von der hier befolgten oder einer ähnlichen Methodik Aufschlüsse über die so rätselhaft erscheinenden Stoffwechselbeeinflussungen durch minimalste Substanzmengen erwarten.

Autorenverzeichnis.

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig



